

UNTERSUCHUNGEN ZUM
PARENTALEN
IMMUNGLOBULINTRANSFER
BEI DER TAUBE
(COLUMBA LIVIA, GMEL.,
1789, DOMESTICA)

RICARDA GREUEL

Disbui. München

1988



Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Josef Kösters

UNTERSUCHUNGEN ZUM PARENTALEN
IMMUNGLOBULINTRANSFER
BEI DER TAUBE
(COLUMBA LIVIA, GMEL., 1789, DOMESTICA)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ricarda Greuel
aus Bonn

München 1988

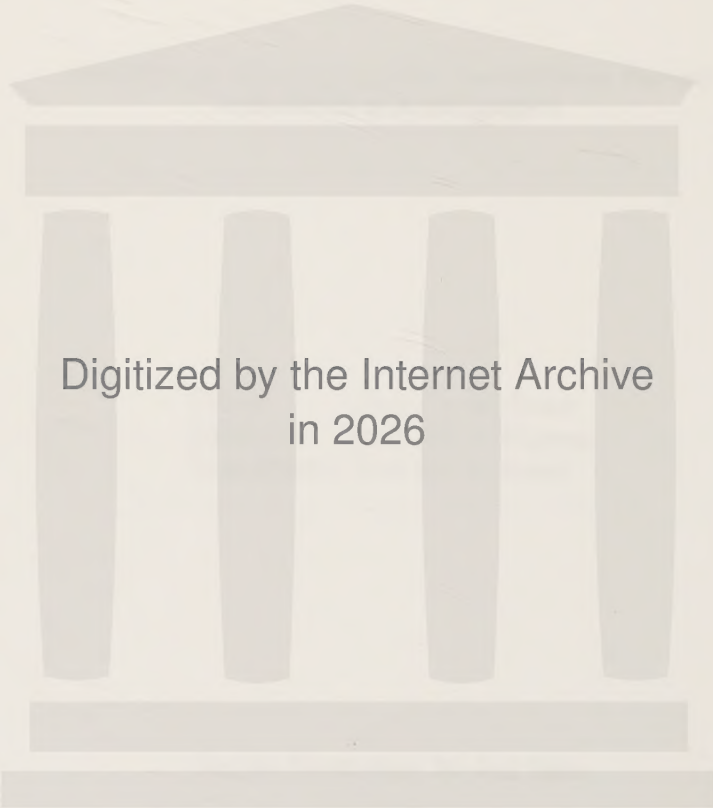
Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Prof. Dr. J. Kösters
Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
2. Aufgaben	2
3. Ziele	3
4. Methodik	4
5. Ergebnisse	5
6. Diskussion	6
7. Zusammenfassung	7
8. Literaturverzeichnis	8
9. Anlagen	9
10. Meinen Eltern in Dankbarkeit	10
11. Zusammenfassung	11
12. 1.1. Zielsetzung	12
13. 1.2. Aufgaben	13
14. 1.3. Ziele	14
15. 1.4. Methodik	15
16. 1.5. Ergebnisse	16
17. 1.6. Diskussion	17
18. 1.7. Zusammenfassung	18
19. 1.8. Literaturverzeichnis	19
20. 1.9. Anlagen	20
21. 2.1. Zielsetzung	21
22. 2.2. Aufgaben	22
23. 2.3. Ziele	23
24. 2.4. Methodik	24
25. 2.5. Ergebnisse	25
26. 2.6. Diskussion	26
27. 2.7. Zusammenfassung	27
28. 2.8. Literaturverzeichnis	28
29. 2.9. Anlagen	29
30. 3.1. Zielsetzung	30
31. 3.2. Aufgaben	31
32. 3.3. Ziele	32
33. 3.4. Methodik	33
34. 3.5. Ergebnisse	34
35. 3.6. Diskussion	35
36. 3.7. Zusammenfassung	36
37. 3.8. Literaturverzeichnis	37
38. 3.9. Anlagen	38
39. 4.1. Zielsetzung	39
40. 4.2. Aufgaben	40
41. 4.3. Ziele	41
42. 4.4. Methodik	42
43. 4.5. Ergebnisse	43
44. 4.6. Diskussion	44
45. 4.7. Zusammenfassung	45
46. 4.8. Literaturverzeichnis	46
47. 4.9. Anlagen	47
48. 5.1. Zielsetzung	48
49. 5.2. Aufgaben	49
50. 5.3. Ziele	50
51. 5.4. Methodik	51
52. 5.5. Ergebnisse	52
53. 5.6. Diskussion	53
54. 5.7. Zusammenfassung	54
55. 5.8. Literaturverzeichnis	55
56. 5.9. Anlagen	56
57. 6.1. Zielsetzung	57
58. 6.2. Aufgaben	58
59. 6.3. Ziele	59
60. 6.4. Methodik	60
61. 6.5. Ergebnisse	61
62. 6.6. Diskussion	62
63. 6.7. Zusammenfassung	63
64. 6.8. Literaturverzeichnis	64
65. 6.9. Anlagen	65
66. 7.1. Zielsetzung	66
67. 7.2. Aufgaben	67
68. 7.3. Ziele	68
69. 7.4. Methodik	69
70. 7.5. Ergebnisse	70
71. 7.6. Diskussion	71
72. 7.7. Zusammenfassung	72
73. 7.8. Literaturverzeichnis	73
74. 7.9. Anlagen	74
75. 8.1. Zielsetzung	75
76. 8.2. Aufgaben	76
77. 8.3. Ziele	77
78. 8.4. Methodik	78
79. 8.5. Ergebnisse	79
80. 8.6. Diskussion	80
81. 8.7. Zusammenfassung	81
82. 8.8. Literaturverzeichnis	82
83. 8.9. Anlagen	83
84. 9.1. Zielsetzung	84
85. 9.2. Aufgaben	85
86. 9.3. Ziele	86
87. 9.4. Methodik	87
88. 9.5. Ergebnisse	88
89. 9.6. Diskussion	89
90. 9.7. Zusammenfassung	90
91. 9.8. Literaturverzeichnis	91
92. 9.9. Anlagen	92
93. 10.1. Zielsetzung	93
94. 10.2. Aufgaben	94
95. 10.3. Ziele	95
96. 10.4. Methodik	96
97. 10.5. Ergebnisse	97
98. 10.6. Diskussion	98
99. 10.7. Zusammenfassung	99
100. 10.8. Literaturverzeichnis	100
101. 10.9. Anlagen	101
102. 11.1. Zielsetzung	102
103. 11.2. Aufgaben	103
104. 11.3. Ziele	104
105. 11.4. Methodik	105
106. 11.5. Ergebnisse	106
107. 11.6. Diskussion	107
108. 11.7. Zusammenfassung	108
109. 11.8. Literaturverzeichnis	109
110. 11.9. Anlagen	110
111. 12.1. Zielsetzung	111
112. 12.2. Aufgaben	112
113. 12.3. Ziele	113
114. 12.4. Methodik	114
115. 12.5. Ergebnisse	115
116. 12.6. Diskussion	116
117. 12.7. Zusammenfassung	117
118. 12.8. Literaturverzeichnis	118
119. 12.9. Anlagen	119
120. 13.1. Zielsetzung	120
121. 13.2. Aufgaben	121
122. 13.3. Ziele	122
123. 13.4. Methodik	123
124. 13.5. Ergebnisse	124
125. 13.6. Diskussion	125
126. 13.7. Zusammenfassung	126
127. 13.8. Literaturverzeichnis	127
128. 13.9. Anlagen	128
129. 14.1. Zielsetzung	129
130. 14.2. Aufgaben	130
131. 14.3. Ziele	131
132. 14.4. Methodik	132
133. 14.5. Ergebnisse	133
134. 14.6. Diskussion	134
135. 14.7. Zusammenfassung	135
136. 14.8. Literaturverzeichnis	136
137. 14.9. Anlagen	137
138. 15.1. Zielsetzung	138
139. 15.2. Aufgaben	139
140. 15.3. Ziele	140
141. 15.4. Methodik	141
142. 15.5. Ergebnisse	142
143. 15.6. Diskussion	143
144. 15.7. Zusammenfassung	144
145. 15.8. Literaturverzeichnis	145
146. 15.9. Anlagen	146
147. 16.1. Zielsetzung	147
148. 16.2. Aufgaben	148
149. 16.3. Ziele	149
150. 16.4. Methodik	150
151. 16.5. Ergebnisse	151
152. 16.6. Diskussion	152
153. 16.7. Zusammenfassung	153
154. 16.8. Literaturverzeichnis	154
155. 16.9. Anlagen	155
156. 17.1. Zielsetzung	156
157. 17.2. Aufgaben	157
158. 17.3. Ziele	158
159. 17.4. Methodik	159
160. 17.5. Ergebnisse	160
161. 17.6. Diskussion	161
162. 17.7. Zusammenfassung	162
163. 17.8. Literaturverzeichnis	163
164. 17.9. Anlagen	164
165. 18.1. Zielsetzung	165
166. 18.2. Aufgaben	166
167. 18.3. Ziele	167
168. 18.4. Methodik	168
169. 18.5. Ergebnisse	169
170. 18.6. Diskussion	170
171. 18.7. Zusammenfassung	171
172. 18.8. Literaturverzeichnis	172
173. 18.9. Anlagen	173
174. 19.1. Zielsetzung	174
175. 19.2. Aufgaben	175
176. 19.3. Ziele	176
177. 19.4. Methodik	177
178. 19.5. Ergebnisse	178
179. 19.6. Diskussion	179
180. 19.7. Zusammenfassung	180
181. 19.8. Literaturverzeichnis	181
182. 19.9. Anlagen	182
183. 20.1. Zielsetzung	183
184. 20.2. Aufgaben	184
185. 20.3. Ziele	185
186. 20.4. Methodik	186
187. 20.5. Ergebnisse	187
188. 20.6. Diskussion	188
189. 20.7. Zusammenfassung	189
190. 20.8. Literaturverzeichnis	190
191. 20.9. Anlagen	191
192. 21.1. Zielsetzung	192
193. 21.2. Aufgaben	193
194. 21.3. Ziele	194
195. 21.4. Methodik	195
196. 21.5. Ergebnisse	196
197. 21.6. Diskussion	197
198. 21.7. Zusammenfassung	198
199. 21.8. Literaturverzeichnis	199
200. 21.9. Anlagen	200



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546201_0018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literatur	3
2.1	Aviäre Immunglobuline IgG und IgA	3
2.2	Passiver Immunglobulintransfer über das Ei und Embryo- naalentwicklung	5
2.3	Postnataler Immunglobulintransfer	7
3	Material und Methoden	8
3.1	Tiermaterial	8
3.1.1	Tauben	8
3.1.2	Kaninchen	8
3.2	Gewinnung und Vorbereitung der Proben für die quanti- tative Bestimmung von Immunglobulinen	8
3.2.1	Serum	8
3.2.2	Eiklar	9
3.2.3	Eidotter	9
3.2.4	Amnionflüssigkeit	10
3.2.5	Dottersackmaterial der Eintagsküken	10
3.2.6	Kropfmilch der Eintagsküken	10
3.3	Isolierung und Reinigung der Immunglobuline IgG und IgA zur Antikörpergewinnung durch Kaninchen	11
3.3.1	Isolierung und Reinigung von IgG aus dem Tau- benserum	11
3.3.2	Isolierung von schweren und leichten Ketten aus dem IgG-Gesamtmolekül	11
3.3.3	Isolierung und Reinigung von IgA aus der Tauben- kropfmilch	12
3.4	Reinheitsüberprüfung und Molekulargewichtsbestimmung	13
3.5	Proteinbestimmung	17
3.6	Herstellung von Antiseren gegen die Immunglobulinfrak- tionen IgG und IgA der Taube	17
3.6.1	Absättigung des Antiserums	18
3.7	Serologisches Verfahren zur Konzentrationsbestimmung .	18

4	Ergebnisse	21
4.1	Isolierung und Reinigung von IgG aus dem Taubenserum	21
4.2	Gewinnung und Reinigung der schweren und leichten Ketten aus dem Gesamtmolekül IgG	21
4.3	Isolierung und Reinigung von IgA aus der Taubenkopfmilch	22
4.4	Reinheitsüberprüfung und Molekulargewichtsbestimmung	26
4.5	Überprüfung der Monospezifität der hergestellten Antisera gegen die Immunglobuline IgA und IgG der Taube . .	33
4.6	Serologisches Verfahren zur Konzentrationsbestimmung .	35
4.7	Ergebnisse der mit Hilfe der Rocket-Immunelektrophorese durchgeführten Konzentrationsbestimmungen von IgG und IgA in den untersuchten Proben	38
4.7.1	Tabellarische Übersicht über die gemessenen Konzentrationen von IgG und IgA in den untersuchten Proben	41
5	Diskussion	45
5.1	Besprechung der Methoden	45
5.2	Besprechung der Ergebnisse	47
6	Zusammenfassung	54
	Summary	55
	Resumen	56
	Literaturverzeichnis	57
	Lebenslauf	66

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung des IgG-Moleküls	3
2	Schematische Darstellung der verschiedenen IgA-Strukturen	4
3	Isolierung von IgG (Chromatographische Trennung) . . .	23
4	Isolierung von schweren und leichten Ketten aus dem Gesamtmolekül IgG (Chromatographische Trennung)	24
5	Isolierung von IgA (Chromatographische Trennung) . . .	25
6	Reinigung von IgG (PAGE)	26
7	Reinigung von schweren und leichten Ketten aus dem Gesamtmolekül IgG (PAGE)	27
8	Reinigung von IgA (PAGE)	28
9	Eichgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts von IgG	29
10	Eichgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts von IgA	30
11	Eichgerade zur Bestimmung der Molekulargewichte der α -Kette und γ -Kette	31
12	Überprüfung der Monospezifität des IgA-Antiserums (Immunoelektrophorese nach Scheidegger)	33
13	Überprüfung der Monospezifität des IgG-Antiserums (Agargelpräzipitation nach Ouchterlony)	34
14	Abhängigkeit der Präzipitationshöhe von der IgG-Konzentration in der Rocket-Immunoelektrophorese	35
15	Abhängigkeit der Präzipitationshöhe von der IgA-Konzentration in der Rocket-Immunoelektrophorese	36
16	Beispiel der Konzentrationsbestimmung in der Rocket-Immunoelektrophorese	37
17	Serum-IgG-Konzentrationen der Taubenküken bzw. Jungtauben zwischen dem 1. und 28. Lebenstag	44

Tabellenverzeichnis

1	Immunisierungsschema der Kaninchen	17
2	Molekulargewichte von IgG und IgA sowie deren Unter- einheiten	32
3	Männliche Tauben, Konzentrationen von IgG und IgA im Serum	41
4	Weibliche Tauben, Konzentrationen von IgG und IgA im Serum, Eiklar und Eidotter	41
5	Eintagsküken, Konzentrationen von IgG und IgA im Se- rum vor und nach der Kropfmilchaufnahme	42
6	Eintagsküken, Konzentrationen von IgG und IgA in Dot- tersack und Kropfmilch	42
7	Jungtauben, Serumkonzentrationen von IgG und IgA zwi- schen dem 2. und 28. Lebenstag	43

1 Einleitung

Die zur Klasse „Aves“ gehörende Ordnung der „Columbiformes“ gliedert sich wiederum in viele Arten, die sich alle durch ein gemeinsames Brutpflegeverhalten auszeichnen.

Gegenstand vorliegender Untersuchungen ist die sich stammesgeschichtlich von der Felsentaube ableitende Haustaube (*Columba livia*, Gmel., 1789, *domestica*), die aus Gründen der Vereinfachung im weiteren als Taube bezeichnet wird.

Als Vertreter der sogenannten Nesthocker weist die Taube gegenüber anderen Nesthockern einige Besonderheiten auf.

Das aus maximal 2 Eiern bestehende Gelege wird 17 Tage von beiden Eltern abwechselnd bebrütet. Mit einem Gewicht von ca. 14g schlüpfen die Geschwister zumeist im Abstand von einem Tag, worauf die Eltern sofort mit der intensiven Brutpflege beginnen. Die Jungtiere erhalten individuell etwas variierend etwa 16 Tage lang die sogenannte Kropfmilch. Diese wird unter dem hormonellen Einfluß des Prolaktins ab dem 8. – 12. Tag der Brut (Weber, 1962; Dumont, 1965) von beiden Eltern produziert und stellt in der ersten Lebenswoche die alleinige Nahrungsquelle für die Taubenküken dar. Es handelt sich um eine aus verfetteten Epithelzellen bestehende Substanz, die sich durch einen hohen Eiweiß- (13,39%) und Fettgehalt (7,95%) auszeichnet.

Infolge der Fütterung von Kropfmilch sind Tauben die am schnellsten wachsenden Wirbeltiere (Vogel, 1981). Bereits am 2. Lebenstag hat sich das Schlupfgewicht verdoppelt. Nach 28 Lebenstagen ist das Körperwachstum abgeschlossen und das Federkleid vollständig ausgebildet.

Obwohl Tauben zumeist aus Liebhaberei gehalten werden, haben sie wegen des Futterkonsums und des Bedarfsartikelverbrauchs für Landwirtschaft und Volkswirtschaft eine erhebliche ökonomische Bedeutung. Allein für Futterkosten werden die jährlichen Ausgaben auf ca. 300 Mio. DM geschätzt, die zum Großteil der deutschen Landwirtschaft zugute kommen.

Die Verluste, die durch das gehäufte Auftreten von Seuchen, wie vor allem Salmonellosen, Paramyxovirusinfektionen und Ornithosen entstehen sind beträchtlich und legen die Notwendigkeit einer geeigneten Immunprophylaxe nahe. Dies wiederum setzt ein näheres Wissen über das Immunsystem der Taube voraus, über das bis heute nur recht spärliche Untersuchungen vorliegen, obwohl gerade dieser Vogel schon sehr früh

experimentell bursektomiert wurde (Riddle und Tange, 1928).

Neben der grundsätzlichen Möglichkeit eines passiven Immunglobulintransfers auf die Jungtiere über das Ei, besitzt die Taube zusätzlich die Möglichkeit durch die Kropfmilch beider Elterntiere, die ähnlich eines Kolostrums Immunglobuline enthält, ihre Jungen zu versorgen. Es ist damit zu rechnen, daß die passiv erworbenen Antikörpermengen durch die enorme Gewichtsentwicklung der Jungtauben einen starken Verdünnungseffekt erfahren. Einen entsprechenden Hinweis gibt die zunehmende Infektionsbereitschaft nach der eigentlichen Kropfmilchperiode in der 2. bis 3. Lebenswoche (Vogel, 1983).

Da die Kropfmilch von den drei bei Vögeln vorkommenden Immunglobulinen lediglich IgG und IgA enthält (Goudswaard et al. 1977), wurde in diesen Untersuchungen der Frage nachgegangen, in welchem Umfang ein passiver Transfer dieser Immunglobuline stattfindet. Die bis heute nur lückenhaft vorliegenden Ergebnisse sind ausschließlich qualitativer Art, und sollen in dieser Arbeit durch quantitative Untersuchungen ergänzt werden.

2 Literatur

2.1 Aviäre Immunglobuline IgG und IgA

Das Vorkommen von drei dem Säuger homologen Immunglobulinklassen, IgG, IgM und IgA, im Serum und verschiedenen Sekreten der Vögel ist gesichert (Leslie und Clem, 1969; Orlans und Rose, 1972; Lebacqz-Verheyden et al., 1972; Bienenstock et al., 1973; Schraner et al., 1982). Diesbezügliche Untersuchungen sind insbesondere beim Huhn jedoch auch bei anderen Hausgeflügelarten unternommen worden (Literaturübersicht bei Rose und Orlans, 1981). Für die Existenz eines dem Säuger-IgE ähnlichen Antikörpers bei Vögeln gibt es Hinweise (Guttman et al., 1971; Burns und Maxwell, 1981). Chen et al. (1982) beschreiben ein dem Säuger-IgD entsprechendes Immunglobulin.

Immunglobulin IgG

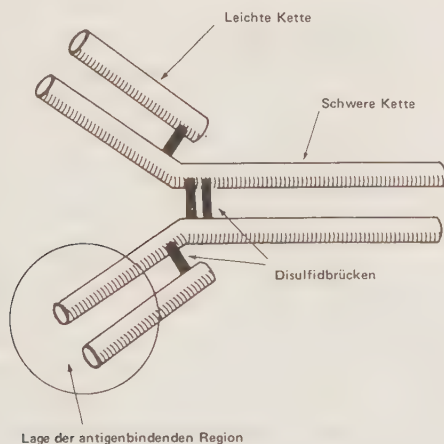


Abbildung 1: Schematische Darstellung des IgG-Moleküls (Tizard, 1981)

Wie beim Menschen tritt auch das aviäre IgG ausschließlich in der monomeren Struktur auf (Abb. 1) und bildet die Hauptmenge der im Serum vorkommenden Antikörper. Unterschiede zum IgG des Menschen bestehen hinsichtlich des Molekulargewichts und der Sedimentationskonstanten. Das IgG-Molekül des Haushuhns ist durch ein Molekulargewicht

von 170.000 bei einer Sedimentationskonstanten von 7,1S charakterisiert (Leslie und Clem, 1969), während beim Menschen ein Molekulargewicht von 150.000 bei einer Sedimentationskonstanten von 7,0S angegeben wird (Roitt, 1977). Aus diesem Grund schlagen Leslie und Clem (1969) für dieses beim Huhn identifizierte Immunglobulin den Namen IgY vor. Das Vorkommen und die Verteilung des IgG und der beiden anderen Immunglobuline in Serum, Sekreten, Ei und Embryo des Haushuhns ist bezüglich der Qualität und Quantität eingehend untersucht (Leslie et al., 1971; Lebacqz-Verheyden et al., 1974; Rose et al., 1974; Rammensee, 1984). Für die Taube liegen bis heute lediglich qualitative Untersuchungen vor (Goudswaard et al., 1977). Das IgG der Taube kann im Taubenserum, im Eidotter, in der Kropfmilch sowie in Milz und Darmmukosa nachgewiesen werden.

Immunglobulin IgA

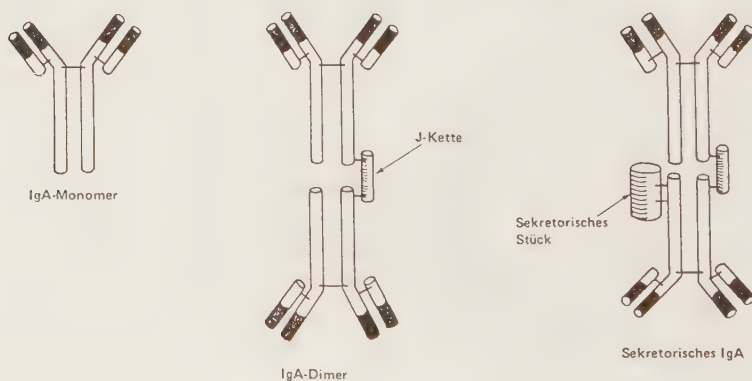


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen IgA-Strukturen (Tizard, 1981)

IgA tritt wie beim Menschen in verschiedenen Strukturen auf. In monomerer und dimerer Form kommt es nebeneinander im Serum vor (Schraner und Lösch, 1986), während es in verschiedenen Sekreten, wie Darmsekret und Galle, als sogenanntes sekretorisches IgA vorliegt und hier bei der lokalen Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt (Porter und Parry, 1976; Sanders und Case, 1977). Die Molekulargewichte liegen beim

Haushuhn für monomeres IgA bei 170.000 und für dimeres IgA bei 360.000 (Leslie und Martin, 1973) bzw. 340.000 (Schranner und Lösch, 1986), das der die beiden Moleküle zusammenhaltenden J-Kette bei 19.000 (Kobayashi und Hirai, 1980). Die in den Epithelzellen der Schleimhäute synthetisierte Sekretkomponente besitzt wie beim Menschen ein Molekulargewicht von ca. 70.000. Sie erleichtert den transzellulären pinozytoseartigen Transport des Moleküls und schützt es vor proteolytischem Abbau (Bienenstock et al., 1973; Watanabe und Kobayashi, 1974; Watanabe et al., 1975; Leslie et al., 1976; Steward, 1984).

Für das IgA der Taube nehmen Goudswaard et al. (1979) ähnliche Molekulargewichte an. Die Autoren weisen dieses Immunglobulin im Serum, Gallensekret, Darmsekret, Eiklar, Speichel, in der Kropfmilch, Milz und Darmmukosa nach. Die Gewinnung des Gallensekrets stellt bei der Taube durch das Fehlen der Gallenblase ein besonderes Problem dar. Die oben genannten Autoren beschreiben eine Operationsmethode, die das Anlegen einer Fistel vorsieht.

Das über den Darm ausgeschiedene IgA (Edwards et al., 1969) spielt in Verbindung mit dessen Verbreitung mit dem Federstaub eine entscheidende Rolle bei einer beim Menschen unter der Bezeichnung „Taubenzüchterlunge“ bekannten allergischen Reaktion (Sennekamp et al., 1974; Müller et al., 1976; Goudswaard et al., 1978).

2.2 Passiver Immunglobulintransfer über das Ei und Embryonalentwicklung

Das über das Hühnerei übertragene IgG entstammt dem Serum des Muttertieres, passiert selektiv das Follikelepithel des Ovars und reichert sich in der reifenden Oozyste an. Mit dem Dotter gelangt es somit in das abgelegte Ei (Buxten, 1952; Patterson et al., 1962; Malkinson 1965; Loeken und Roth, 1982). Die Konzentration von IgG im Dotter steigt und sinkt in Abhängigkeit von der Serumkonzentration, wobei letztere jedoch höher ist (Kowalczyk et al., 1985; Lösch et al., 1986). Das im Hühnerei vorhandene IgA wird zusammen mit dem IgM im Ovidukt dem Eiklar beigegeben. Über den Ort der Synthese sowie über den Mechanismus der Sekretion herrschen noch Unklarheiten. Es wird jedoch angenommen, daß die Immunglobuline aus dem Serum stammen (Yamamoto et al., 1975). Während der Embryonalentwicklung findet eine Umverteilung der Immunglobuline in den verschiedenen Eikompar-

timenten statt. Zunächst ist das IgG vorwiegend im Eidotter vorhanden. Yamamoto et al. (1975) identifizieren es jedoch auch im Eiklar des Hühnereies. Die den Dotter umgebende Membrana vitellina beginnt bereits nach dem 4. Bebrütungstag zunehmend durchlässig zu werden (Hamilton, 1952), um sich im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung vollständig aufzulösen (Saito und Martin, 1966). Diese Tatsache erlaubt eine Diffusion von IgG und weiteren Dotterproteinen in das Eiklar und umgekehrt (Kramer und Cho, 1969). Am 13. Bebrütungstag (Romanoff, 1960) öffnet sich beim Hühnerembryo eine als „seroamniotic connection“ bezeichnete Verbindung zwischen Amnion und Eiklar, welches einen Übertritt des Eiklars in das Amnion zur Folge hat. Diese Mischung wird im weiteren vom Embryo abgeschluckt, jedoch offensichtlich werden keine im Eiklar vorhandenen Immunglobuline über den Darm resorbiert (Ziegelmaier, 1969). Das Dotter-IgG wird selektiv über den Dottersackkreislauf in die Blutbahn des Embryos geschleust (Loeken und Roth, 1983; Kowalczyk et al., 1985). Der verbleibende Rest des Dottersacks wird durch ein in der Dottersackwand neu gebildetes Myoepithel in den Darm gepresst und dient dem Küken zunächst als erste Nahrung (Fehèr, 1975).

Im Zusammenhang mit diesen Vorgängen darf eine gewisse Eigensynthese von Immunglobulinen durch den Embryo nicht unberücksichtigt bleiben (Reade et al., 1965). Durch die Bildung des Thymus auf der einen Seite und der Bursa Fabricii auf der anderen Seite stellt der Vogelembryo ein ideales Modell zum Verständnis einer zellvermittelten, T-zellabhängigen und einer humoralen, B-zellabhängigen Immunabwehr dar. Schon in frühen Entwicklungsstadien können beim Hühnerembryo Zellen mit Immunglobulin-Oberflächendeterminanten gefunden werden. Bereits am 5. Tag der Bebrütung reagieren einige Dottersackzellen mit einem IgA-Antiserum. In der Bursa Fabricii sind zunächst Anti-IgM und Anti-IgA reagierende Zellen nachzuweisen (Albini und Wick, 1976). Mit Anti-IgG reagierende Zellen identifizieren die oben genannten Autoren am 16. Bebrütungstag, während Lebacqz-Verheyden et al. (1979) das Vorhandensein dieser Zellen um den 13. Tag ansetzen. Alle Untersuchungen diesbezüglich stimmen dahingehend überein, daß in frühen Entwicklungsstadien zunächst die IgM-Synthese im Vordergrund steht. Die Bursa Fabricii ist offensichtlich für die Umschaltung von der IgM-Synthese auf IgG-Synthese verantwortlich (Kincade und Cooper, 1971).

Ob diese beim Haushuhn beschriebenen Verhältnisse auf die Taube zu

übertragen sind, erscheint fraglich. Neonatale Bursektomie innerhalb der ersten zwei Stunden nach dem Schlupf beeinflußt die Immunantwort der Jungtauben auf eine im Alter von 4 Wochen vorgenommene Immunisierung mit Schaferythrozyten nicht. Dies betrifft sowohl die Bildung von hämagglutinierenden Antikörpern als auch den Serumspiegel von mercaptoäthanol-empfindlichen und -resistenten Antikörpern (Thaxton und Grissom, Jr. 1984). Die Autoren bestätigen hierdurch frühere Ergebnisse von Thompson und Linna (1975), die die Bursektomie jedoch etwas später innerhalb der ersten 24 Lebensstunden ausführen.

2.3 Postnataler Immunglobulintransfer

Der postnatale Immunglobulintransfer über die Taubenkropfmilch stellt in der Vogelwelt eine Ausnahme dar. Einen ersten Hinweis auf eine sicher zu beschränkende Vergleichbarkeit mit dem Kolostrum des Säugers geben Meyer und Seibert (1987). Durch isoelektrische Fokussierung und Polyacrylamidgelelektrophorese stellen sie die verschiedenen Kropfmilchproteine in zeitlicher Abhängigkeit vom jeweiligen Brutpflegestadium dar. Hier zeigen die Autoren, daß Proteine mit hohem Molekulargewicht ab dem 10. Tag der Brutpflege fast völlig aus der Kropfmilch verschwunden sind.

Die wichtigste Information über den postnatalen Immunglobulintransfer von IgG und IgA der Taube geben Goudswaard et al. (1979). Durch intravenöse Verabreichung von radioaktivmarkierten Antikörpern IgA und IgG an die Elterntiere kurz vor dem Schlupf der Taubenküken, weisen die Autoren nach, daß IgA und auch in weit geringerem Maße IgG über die elterliche Kropfmilch ausgeschieden wird und bei 3 Tage alten Taubenküken im Serum vorhanden ist. Da weder in der Schleimhaut des laktierenden Kropfes noch in den Speicheldrüsen sowie deren umliegenden Gewebe Plasmazellen nachzuweisen sind, ist ein Übertritt von Immunglobulinen aus dem Serum eventuell via Speichel in den Kropf anzunehmen. Für die Resorption der Immunglobuline werden Pinozytosevorgänge im Darm der Taubenküken verantwortlich gemacht.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermaterial

3.1.1 Tauben

Folgende Tiere wurden für die Untersuchung verwendet:

- 8 Taubenpaare (*Columba livia*, Gmel., 1789, *domestica*)
- die Nachkommenschaft der Elterntiere während eines Jahres

Die Tauben waren vor der Anpaarung frei von Antikörpern gegen aviäres Paramyxovirus I und gegen *Salmonella typhimurium*, sowie frei von Darmparasiten und Trichomonaden.

Unterbringung und Fütterung

Während der Brutzeit wurden die Tiere in einer großen Außenvoliere gehalten, die mit Palosan-Schlageinstreu für Tauben und Geflügel (Fa. Ytong AG, Silicalzit-Vertrieb, München) eingestreut war. Den Tauben standen Nistschalen sowie Nistmaterial in ausreichendem Maße zur Verfügung. Ein Tauben-Körner-Alleinfutter (Natural Standard, Fa. Gebr. de Scheemaeker, Belgien) zusammen mit Grit (Natural Grit, gleiche Firma) sowie frisches Trinkwasser konnten von den Tieren ad libitum aufgenommen werden.

3.1.2 Kaninchen

6 Kaninchen wurden in Einzelkäfigen auf Stroheinstreu gehalten. Sie erhielten ein pelletiertes Alleinfutter (Club-Kanin, Club-Kraftfutterwerke GmbH). Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

3.2 Gewinnung und Vorbereitung der Proben für die quantitative Bestimmung von Immunglobulinen

3.2.1 Serum

Blut wurde aus der Vena cutanea ulnaris der Tauben entnommen, 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 10 min bei 2000 g zentrifugiert.

Zur Bestimmung der IgA-Konzentration im Eintagsküken- und Jungtaubenserum wurde dieses lyophilisiert und in einem Fünftel des Ausgangsvolumens in aqua bidest. aufgenommen.

3.2.2 Eiklar

Das Eiklar wurde sorgfältig vom Dotter getrennt und danach das Volumen bestimmt. Dem Eiklar wurden $10\mu\text{l}$ einer 1M Dithiothreitolösung (DTT, Sigma) zugegeben (Kaspers, 1987). Die Probe wurde 10min bei Zimmertemperatur gerührt. Das Eiklar war nun von leicht pipettierbarer Konsistenz und konnte ohne weitere Behandlung zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden.

Zur Kontrolle dieses neuen, einfachen Verfahrens wurden zwei Eiklarproben nach Rose et al. (1974) präpariert. Hierzu mußte das Eiklar zunächst zur Fällung der Muzine mit 0,1N H_2SO_4 behandelt werden, bis ein pH-Wert von 5,0 – 5,55 erreicht war. Anschließend wurde die Eiklarprobe bei 12.000g 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,1N NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und konnte dann zur Messung verwendet werden.

3.2.3 Eidotter

Der Eidotter wurde durch vorsichtiges Rollen auf einem mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2)¹ angefeuchteten Filterpapier von eventuell anhaftenden Eiklarresten befreit. Die Präparation erfolgte nach Burstein und Samaille (1959). Dem Dotter wurden 12ml PBS pH 7,2 zugegeben und das Volumen bestimmt. Die Entfettung der Dotterproben erfolgte mit Dextransulfat und Kalziumchlorid. Pro 10ml verdünntem Dottermaterial wurden 0,4ml einer 10%-igen Dextransulfatlösung zugegeben und 20min gerührt. Anschließend wurde pro 10ml Probevolumen 1ml einer 1M Kalziumchloridlösung zupipettiert und erneut 10min gerührt. Das Fett wurde durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 12.000g entfernt. Nach der Entfettung wurde das Probevolumen erneut bestimmt. Zur quantitativen Bestimmung von IgA im Dot-

¹ PBS pH 7,2

NaCl	=	0,58 g
KH_2PO_4	=	0,41 g
Natriumazid	=	0,02 g
aqua bidest. ad		100ml

ter wurde das aufgearbeitete Material durch Lyophilisierung und erneute Aufnahme in einem Zehntel des Ausgangsvolumens konzentriert.

3.2.4 Amnionflüssigkeit

Die Amnionflüssigkeit wurde nach dem Öffnen der Eier am 9. und 11. Bebrütungstag durch Punktion und Aufziehen in eine 1 ml Einmalspritze gewonnen und konnte ohne weitere Bearbeitung zur Messung verwendet werden.

3.2.5 Dottersackmaterial der Eintagsküken

Nach Tötung der Eintagsküken wurden die Dottersäcke in toto entnommen, der Inhalt durch Zugabe von 12ml PBS pH 7,2 verdünnt und homogenisiert. Anschließend wurde das Volumen bestimmt. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie unter 3.2.3 bei der Aufbereitung des Dotters beschrieben.

3.2.6 Kropfmilch der Eintagsküken

Die Kropfmilch wurde den am ersten Lebenstag getöteten Küken entnommen. Die Präparation erfolgte nach Goudswaard (1979). Das Material wurde durch Zugabe von 12ml trisgepufferter Kochsalzlösung (TBS, pH 7,4)² verdünnt, homogenisiert und das Volumen bestimmt. Wie bereits unter 3.2.3 beschrieben, kamen zur Entfettung Dextransulfat und Kalziumchlorid zum Einsatz. Nach der Entfettung schloß sich eine erneute Volumenbestimmung an.

Bei der Aufarbeitung der Proben zur quantitativen Messung der Immunglobulinkonzentrationen wurde in allen Fällen auf das Aussalzen der Globuline mit Natriumsulfat oder Ammoniumsulfat verzichtet, um einem hierdurch entstehenden eventuellen Verlust vorzubeugen. Sämtliche gewonnenen Proben wurden bis zum Zeitpunkt der Messung bei -20°C gelagert.

² TBS pH 7,4

NaCl	=	8,2g
Tris	=	1,2g
Natriumazid	=	0,2g
aqua bidest. ad		1000ml

3.3 Isolierung und Reinigung der Immunglobuline IgG und IgA zur Antikörpergewinnung durch Kaninchen

3.3.1 Isolierung und Reinigung von IgG aus dem Taubenserum

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung von IgG diente ein Taubenserum-pool (Serum von 50 Tauben), der mit Dextransulfat (0,06 ml/ml Serum) und Kalziumchlorid (0,15 ml/ml Serum) entfettet und anschließend gegen einen 0,1 M Tris-HCl-Puffer³, pH 8,0 dialysiert (Dialysierschlauch Visking 20/32, Fa. Serva) wurde. Das entfettete Serum wurde zu 50 % mit Ammoniumsulfatlösung gesättigt und 30 min im Eisbad gerührt. Eine Zentrifugation bei 12.000 g für die Dauer von 15 min schloß sich an. Nach Lösung des gewonnenen Präzipitats in dem oben genannten Puffer, erfolgte eine gelchromatographische Trennung auf einer Säule (LKB, 2,6×100 cm) an Ultrogel AcA34 (LKB, Trennbereich 20.000 – 200.000 D). Das Eluat des dritten Peaks enthielt das IgG. Die Eluate mehrerer Säulenläufe wurden gepoolt und gegen einen 0,01 M kochsalzfreien Tris-HCl-Puffer pH 8,0 dialysiert. Die weitere Reinigung erfolgte über eine Anionenaustauschchromatographie an Cellulose DEAE 52 (Fa. Whatman). Zur Elution von IgG wurde ein 0,01 M Tris-HCl-Puffer verwendet, dem 0,06 M NaCl zugegeben worden war (Goudswaard, 1977). Das stark konzentrierte Eluat des ersten Peaks wurde an Ultrogel A6 (LKB, Trennbereich 20.000 – 2.400.000 D) rechromatographiert. Die das hochgereinigte IgG enthaltenden Fraktionen wurden in Polyäthylenglykol (PEG 20.000, Fa. Serva) konzentriert.

3.3.2 Isolierung von schweren und leichten Ketten aus dem IgG-Gesamtmolekül

Die Präparation erfolgte nach Ponstingl und Hilschmann (1976): 3 g Protein sollen in 200 ml 8 M Harnstoff/0,1 M Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen werden. Zur Reduktion werden 1,54 g DTT (Fa. Sigma) zugegeben. Das

³ Tris-HCl-Puffer 0,1 M pH 8,0

Tris	=	12,110 g
NaCl	=	8,766 g
Aminohexansäure	=	0,656 g
Natriumazid	=	0,200 g
aqua bidest. ad		1000 ml

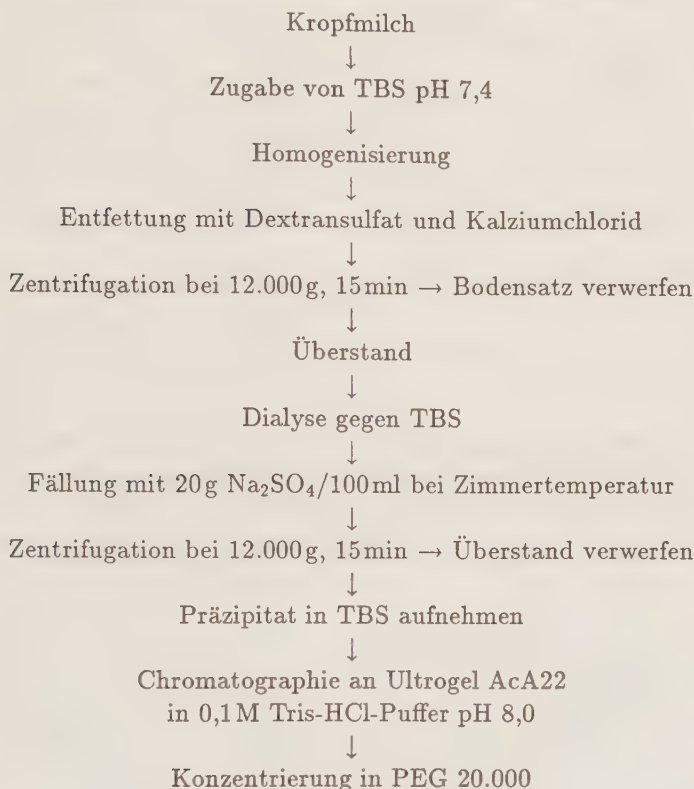
Reaktionsgemisch muß für die Dauer von 4h bei 37°C unter Stickstoffatmosphäre gerührt werden. Die Alkylierung erfolgt durch Zugabe von 9,3g Jodessigsäure. Der pH-Wert wird sofort nach der Alkylierung auf 8,6 eingestellt. Nach 30min wird die Reaktion durch die Zugabe von 3,5ml 2-Mercaptoäthanol gestoppt.

Zum Einsatz kamen 10mg gereinigtes IgG. Die zuzugebende Reagenzienmenge wurde nach dieser Vorschrift errechnet. Nach Konzentrierung in PEG wurde das Reaktionsgemisch gegen den oben genannten Harnstoffpuffer dialysiert und anschließend über eine Säule (LKB, 2,6×100cm) an Sephacryl S 200 (Fa. Pharmacia, Trennbereich 5.000 – 100.000D) mit demselben Puffer chromatographiert.

3.3.3 Isolierung und Reinigung von IgA aus der Taubenkropfmilch

Nach der oben beschriebenen Entfettung wurden die in der Kropfmilch enthaltenen Globuline mit Natriumsulfat ausgefällt. Dies erfolgte durch Zugabe von 20g Natriumsulfat pro 100ml verdünntem, entfettetem Kropfmilchmaterial und nachfolgendem Rühren für die Dauer von 30min. Eine 15-minütige Zentrifugation bei 12.000g schloß sich an. Das durch Zugabe von TBS pH 7,4 in Lösung gebrachte Präzipitat wurde anschließend auf einer Säule (LKB, 2,6×100cm) an AcA22 (LKB, Trennbereich 100.000 – 1.200.000D) in 0,1M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 chromatographiert. Das Eluat des zweiten Peaks enthielt das IgA in hochgereinigter Form. Nach Konzentrierung in PEG konnte es als Standardsubstanz und zur Immunisierung weiter verwendet werden.

Schematische Darstellung der Isolierung von IgA:



3.4 Reinheitsüberprüfung und Molekulargewichtsbestimmung

Die Reinheitsüberprüfung der gewonnenen Immunglobulinfraktionen erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (modifiziert nach Laemmli, 1970). Es wurde ein lineares Porengradientengel von 3 – 15% verwendet. Moleküle mit einem Molekulargewicht von 900.000 – 18.000 konnten hierauf gut getrennt dargestellt werden. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Durch Mitlaufenlassen einer Eichproteinlösung konnten die Molekulargewichte der Proteine bestimmt werden (Shapiro et al., 1967; Warr, 1982).

Puffer und Lösungen

a. Acrylamidlösung (30 %)

Acrylamid	=	29,20 %
N,N'-Methylenbisacrylamid	=	0,80 %
Glycerin	=	25,00 %
Bromphenolblau	=	0,01 mg
aqua bidest. ad		100ml

b. Gelpuffer pH 8,8

Tris-HCl 1,5 M	=	18,17 g
SDS (Na-Dodecyl-Sulfat)	=	0,40 g
aqua bidest. ad		100ml

c. Probenpuffer pH 6,8

Glycerin	=	10,00 %
SDS (Na-Dodecyl-Sulfat)	=	2,30 g
Tris-HCl 0,0625 M	=	0,76 g
aqua bidest. ad		100ml

d. Elektrophoresepuffer pH 8,3 (Stammlösung)

Tris 0,025 M	=	3,09 g
Glycin 0,192 M	=	14,41 g
SDS (Na-Dodecyl-Sulfat)	=	0,10 g
aqua bidest. ad		100ml

Diese Lösung wurde zum Gebrauch im Verhältnis
1:10 mit aqua bidest. verdünnt.

e. Ammoniumpersulfat

Ammoniumpersulfat	=	10,00 g
aqua bidest. ad		100ml

f. TEMED (N,N,N',N',Tetramethyläthylendiamin)

g. 2-Mercaptoäthanol

h. Färbelösung

Äthanol 96 %	=	450ml
aqua bidest.	=	100ml
Coomassie Brilliant Blue	=	5,0g

i. Entfärbelösungen

Lösung A	Äthanol 96 %	=	500ml
	aqua bidest.	=	500ml
Lösung B	Eisessig	=	200ml
	aqua bidest.	=	800ml

Zum Gebrauch wurden die beiden Lösungen
im Verhältnis 1:1 gemischt.

Durchführung

Zwischen zwei nach unten abgedichteten Glasplatten (120×160mm), die durch zwei Plexiglasstäbe auf einen Abstand von 1,2mm gehalten wurden, wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers ein Gradientengel gegossen. Hierzu mußten zwei Acrylamidlösungen mit den Konzentrationen von 3% und 15% hergestellt werden.

Herstellung der Lösungen

a. Lösung mit 3% Acrylamid

Acrylamidlösung (30%)	=	3,0ml
aqua bidest.	=	19,5ml
Gelpuffer	=	7,5ml

b. Lösung mit 15% Acrylamid

Acrylamidlösung (30%)	=	15,0ml
aqua bidest.	=	7,5ml
Gelpuffer	=	7,5ml

Zur chemischen Polymerisation wurden als Katalysatoren jeweils 100µl von der zuvor hergestellten Ammoniumpersulfatlösung und 15µl TEMED zugegeben.

In die hintere Vorratskammer des Gradientenmischers wurden 15ml der Acrylamidlösung mit der Konzentration von 3% gefüllt. Die vordere Kammer wurde mit 15ml der zweiten Acrylamidlösung beschickt. Durch

den gleichzeitigen Auslauf der beiden Vorratsbehälter konnte ein Gel mit einem linearen Gradienten von 3 – 15 % gegossen werden. Da die Acrylamidlösung Bromphenolblau enthielt, war es möglich, die Ausbildung des Gradienten anhand der gleichmäßigen Abnahme der Farbtintensität von unten nach oben zu kontrollieren. Auf den oberen Rand des Gels wurde ein „Kamm“ aufgesetzt, wodurch nach dem Erstarren des Gels – nach etwa einer Stunde – 13 rechteckige Probenaschen von 5×7mm Größe entstanden. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit dem Probenpuffer verdünnt. Zu reduzierende Proben wurden im selben Verhältnis mit dem Probenpuffer unter Zusatz von 5% 2-Mercaptoäthanol verdünnt und anschließend 10min gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei 40mA und war nach etwa 3h beendet.

Folgende Molekulargewichtsmarker kamen zum Einsatz:

a. Calibration Kit for High Molecular Weight Proteins
(Fa. Pharmacia)

	Molekular- gewicht	Unter- einheit
Thyreoglobulin	669.000	330.000
Ferritin	440.000	220.000
Katalase	232.000	60.000
Lactat-Dehydrogenase	140.000	36.000
Bovines Serum Albumin	67.000	67.000

b. Prestained SDS Molecular Weight Standard Mixture
(Fa. Sigma)

Triose-phosphat-Isomerase	26.600
Lactat-Dehydrogenase	36.500
Fumarase	48.500
Pyruvatkinase	58.000
Fructose-6-Phosphat-Kinase	84.000
β -Galactosidase	116.000
α_2 -Macroglobulin	180.000

c. Gereinigte IgG-Zubereitung (IgG Pigeon, Fa. Calbiochem)

Mit Hilfe der Markerproteine konnte für jedes Gel eine Eichgerade erstellt werden. Auf halblogarithmischem Papier wurde die Laufstrecke

der einzelnen Proteine auf dem Gel (Abszisse) gegen den Logarithmus ihrer zugehörigen Molekulargewichte (Ordinate) aufgetragen. Nach der Bestimmung der Laufstrecke des Proteins mit unbekanntem Molekulargewicht konnte das entsprechende Molekulargewicht über den Schnittpunkt mit der Eichgeraden an der Y-Achse abgelesen werden.

3.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der gereinigten Immunglobuline erfolgte nach Lowry (1951).

3.6 Herstellung von Antisera gegen die Immunglobulinfraktionen IgG und IgA der Taube

Zur Produktion von Antisera wurden 6 Kaninchen in 3 Gruppen aufgeteilt und wie in Tab. 1 dargestellt immunisiert.

Immunisierendes Antigen	Erstimmunisierung T_0	Boosterung T_{14}
IgG	50 $\mu\text{g/kg}$ KGH	50 $\mu\text{g/kg}$ KGH
γ -Ketten	50 $\mu\text{g/kg}$ KGH	50 $\mu\text{g/kg}$ KGH
IgA	50 $\mu\text{g/kg}$ KGH	50 $\mu\text{g/kg}$ KGH

Tabelle 1: Immunisierungsschema der Kaninchen

Die erste Immunisierung erfolgte nach Zusatz von 1ml PBS und 1ml Freund'schem komplettem Adjuvans durch intramuskuläre Injektion an drei verschiedenen Körperstellen. Die Boosterung wurde ohne Adjuvans vorgenommen. Nach 5 Tagen konnte die erste Blutentnahme durch Punktion der Arteria auricularis erfolgen. Weitere Boosterungen wurden im Abstand von 3 Wochen durchgeführt. Das gewonnene Blut wurde 2h bei 37°C inkubiert und danach bei 2.000g zentrifugiert.

3.6.1 Absättigung des Antiserums

Die Aktivität der bei allen Immunglobulinfraktionen immunologisch identischen leichten Ketten bedingt serologische Kreuzreaktionen, die bei der Ausführung der quantitativen Elektrophorese sehr störend wirkten. Aus diesem Grund mußte das Antiserum gegen IgA mit IgG haltigen Serumfraktionen abgesättigt werden. Der Erfolg der Absättigung wurde mit Hilfe der Immundiffusion nach Ouchterlony (1948) sowie der Immunelektrophorese nach Scheidegger (1955) überprüft (Abb. 12). Durch die Immunisierung mit γ -Ketten konnte für die quantitative Bestimmung von IgG ein monospezifisches Antiserum verwendet werden. Eine Absättigung erübrigte sich (s. Abb. 13).

3.7 Serologisches Verfahren zur Konzentrationsbestimmung

Die quantitative Erfassung der Immunglobulinkonzentrationen erfolgte durch die in antiserumhaltigem Agar ausgeführte Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell (1966).

Puffer und Lösungen

a. Tris-Barbituratpuffer pH 8,6

Diäthylbarbitursäure	= 112,00 g
Tris	= 121,50 g
Kalziumlaktat	= 2,66 g
Natriumazid	= 3,25 g
aqua bidest. ad	5000 ml

Dieser Stammpuffer wurde zur Herstellung des Agarosegels im Verhältnis 1:5 verdünnt. Als Elektrodenpuffer bei der Ausführung der Elektrophorese kam ebenfalls dieser Puffer im Verhältnis 1:4 verdünnt zum Einsatz.

b. Färbelösung

Äthanol 96 %	=	450 ml
Eisessig	=	100 ml
aqua bidest.	=	450 ml
Coomassie Brilliant Blue (R 250, Fa. Serva)	=	5,0 g

c. Entfärbelösung

Äthanol 96 %	=	250 ml
Eisessig	=	100 ml
aqua bidest.		450 ml

Empfindlicher als die Coomassie-Färbung zur Darstellung von Präzipitationslinien erwies sich die Silberfärbung nach Willoughby und Lambert (1983). Hierzu mußte das Agarosegel zunächst vollständig entfärbt werden.

d. Lösungen zur Silberfärbung

Lösung A	Na_2CO_3	=	25,00 g
	aqua bidest. ad	=	500 ml
Lösung B	Ammoniumnitrat	=	1,00 g
	Wolframatkieselsäure	=	5,00 g
	Formaldehyd 35 %	=	7 ml
	aqua bidest. ad		500 ml

Durchführung der Silberfärbung:

- Gel in 4 % Glutaraldehyd 5 min waschen
- Gel in aqua bidest. 2×5 min waschen
- Silberfärbung
24 ml der Lösung A mit 50 ml der Lösung B in einem Becherglas mischen und das Gel bedecken
Abschluß der Färbung bei gut sichtbar dargestellten Präzipitationslinien
- Stoppbad in Essigsäure 10 %

Durchführung der Rocket-Immunelektrophorese

Zur Herstellung der Gelmatrix wurde eine 1%-ige Agaroselösung in entsprechend verdünntem Tris-Barbituratpuffer hergestellt. Zum Einsatz kam Agarose C (Fa. Pharmacia). Die Agarose wurde durch Erhitzen bis zum Siedepunkt gelöst und anschließend im Wasserbad auf 58°C abgekühlt. In ein hohes Reagenzglas wurde zunächst die benötigte Antiserummenge gegeben und danach 16ml der Agaroselösung zupipettiert. Durch leichtes Schwenken wurde eine gleichmäßige Verteilung des Antiserums in der Agarose erreicht. Die Antiserum-Agarosemischung wurde auf eine Glasplatte von 10×10×0,2cm Größe gegossen. Nach dem Erhitzen konnte die Platte bis zur weiteren Bearbeitung in der feuchten Kammer aufbewahrt werden. In die erstarrte Agaroseschicht wurden 15 Löcher gestanzt, die mit jeweils 4 μ l der zu quantifizierenden Proben beschickt wurden. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht (ca. 12 – 16h) bei einer Feldstärke von 1V/cm in der Kammer Multiphor 2117 (Fa. LKB). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Platte für die Dauer von mindestens 1h in physiologische Kochsalzlösung gelegt, anschließend gepreßt (Filterpapier No. 1, Fa. Whatman) und unter Heißluft getrocknet. Die Coomassie-Färbung schloß sich an.

Herstellung der Eichsubstanz

Von den gereinigten Immunglobulinfraktionen mit bekanntem Proteingehalt wurden Verdünnungsreihen mit quadratisch abnehmenden Konzentrationen hergestellt und auf dem Agarosegel aufgetragen.

Daneben wurden die nach dem gleichen Schema erstellten Verdünnungsstufen eines entfetteten Taubenserumpools aufgetragen (s. Abb. 16).

Auswertung

Die Länge der Präzipitationslinien wurde über einem Leuchtschirm ausgemessen. Die Peakhöhe in cm konnte jeweils einer bestimmten Konzentration (mg/ml) zugeordnet werden. Durch die Erstellung einer Eichgeraden war es möglich, die unbekannte Konzentration des Taubenserumpools zu ermitteln. Der lineare Regressionskoeffizient lag bei $R^2 = 0,99$. Im weiteren Verlauf diente dieser Serumpool zur Einsparung von wertvoller Reinsubstanz für alle quantitativen Untersuchungen als Standard. Die unteren Meßbereichsgrenzen lagen für IgA bei 0,005mg/ml IgG bei 0,010mg/ml.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung und Reinigung von IgG aus dem Tausersum

Da IgG im Serum in relativ großen Mengen vorliegt, bietet sich eine Isolierung daraus an. Nach Entfettung des Serums und Fällung der Globuline zeigte sich bei der Chromatographie an Ultrogel AcA34 ein dreigipfeliges Chromatogramm (Abb. 3).

Der erste Peak bestand aus einer Lipoproteinfraction. Im zweiten Gipfel befanden sich zwei nicht voneinander getrennte Immunglobuline (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese), die in der Agargelpräzipitation nach Ouchterlony aufgrund der Aktivität der leichten Ketten mit dem Antiserum gegen IgG reagierten, jedoch nicht mit IgG identisch waren. Es handelte sich um die ebenfalls im Serum vorkommenden Immunglobuline IgA und IgM.

Das Eluat des dritten Peaks enthielt das IgG sowie weitere Proteine kleineren Molekulargewichtes unter anderem auch in geringen Mengen Serumalbumin (Abb. 6). Die darauf folgende Anionenaustauschchromatographie an DEAE 52 hatte den Vorteil einer starken Konzentration und darüber hinaus den einer effizienten weiteren Reinigung (Abb. 6). Nach einer nochmaligen Gelfiltration an Ultrogel A6 stand ein hochgereinigtes Produkt zur Verfügung (Abb. 6), welches zur weiteren Verarbeitung für die Herstellung von schweren und leichten Ketten sowie als Standardsubstanz bei der quantitativen Elektrophorese verwendet wurde.

4.2 Gewinnung und Reinigung der schweren und leichten Ketten aus dem Gesamtmolekül IgG

Das Chromatogramm ergab ein aus zwei Peaks bestehendes Elutionsmuster (Abb. 4). Der erste Gipfel enthielt vorwiegend die schweren Ketten, im Eluat des zweiten Peaks konnten die leichten Ketten identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden alle immunglobulinhaltigen Eluate auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend die Fraktionen gepoolt, die alleinig H-Ketten bzw. L-Ketten enthielten (Abb. 7). Durch Reduzierung der Elutionsgeschwindigkeit ließ sich das Ergebnis der chromatographischen Trennung optimieren.

Die isolierten schweren Ketten fanden anschließend bei der Immunisie-

rung von Kaninchen ihre Anwendung.

4.3 Isolierung und Reinigung von IgA aus der Taubenkropfmilch

Nach der Entfettung der Kropfmilch und Fällung der Globuline war eine einmalige Gelfiltration an Ultrogel AcA22 ausreichend, um ein hochgereinigtes IgA herzustellen.

Das Chromatogramm zeigte drei Elutionsgipfel (Abb. 5). Das Eluat des ersten Peaks enthielt Lipoproteine. Das im zweiten Peak enthaltene Protein konnte als IgA identifiziert werden (Abb. 5). Der dritte Gipfel enthielt das IgG und Proteine mit geringerem Molekulargewicht.

Durch Auftragen auf ein SDS-Gel und Poolen der entsprechenden Fraktionen des letzten Gipfels gelang es, als Nebenprodukt auch reines Kropfmilch-IgG zu isolieren (Abb. 8).

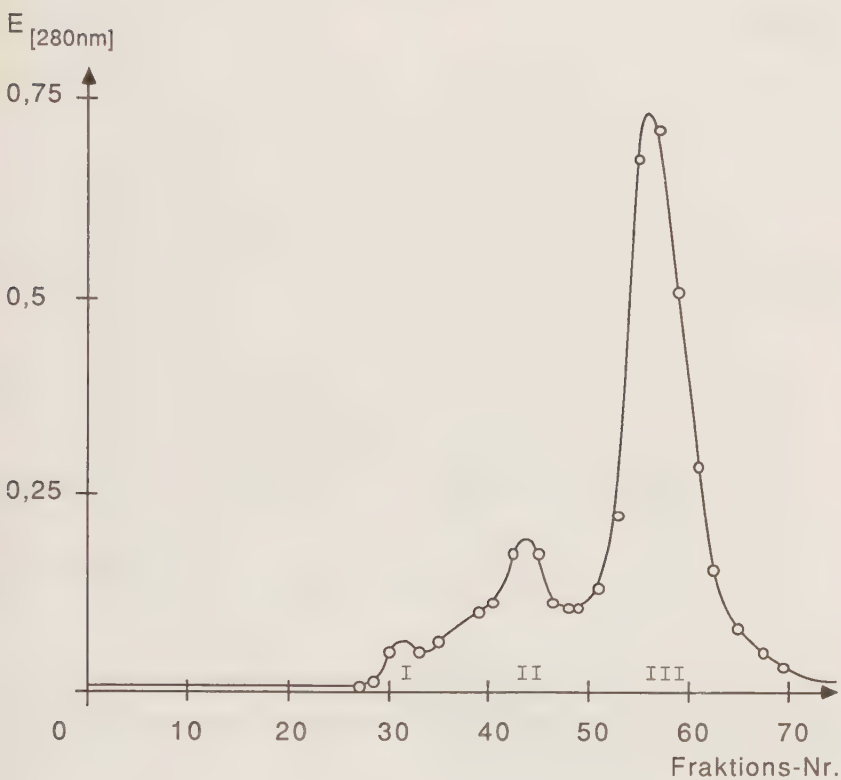


Abbildung 3: Isolierung und Reinigung von IgG, chromatographische Trennung eines entfetteten und durch Ammoniumsulfat globulingefällten Taubenserumpools an Ultrogel AcA34 in Tris-HCl-Puffer pH 8,0
 Elutionsgeschwindigkeit: 5 ml/30 min
 Auftragvolumen: 5 ml

I Lipoproteine

II IgM und IgA des Serums (hier nicht getrennt)

III IgG und andere Serumproteine kleineren Molekulargewichts

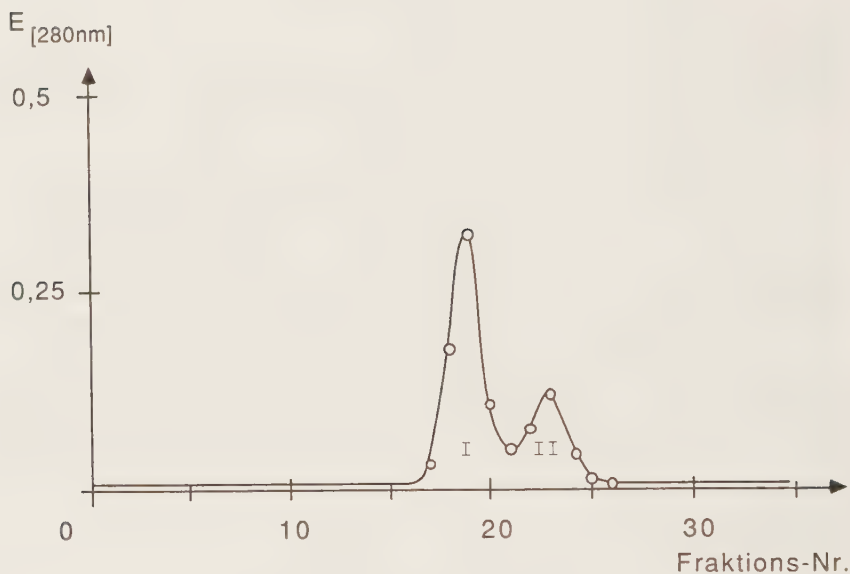


Abbildung 4: Gewinnung der schweren und leichten Ketten aus dem IgG-Gesamt-molekül, chromatographische Trennung an Sephacryl S 200 in 8 M Harnstoff-/0,1 M Tris-Puffer pH 8,0

Elutionsgeschwindigkeit: 5 ml/30 min

Auftragvolumen: 5 ml

I Schwere Ketten

II Leichte Ketten

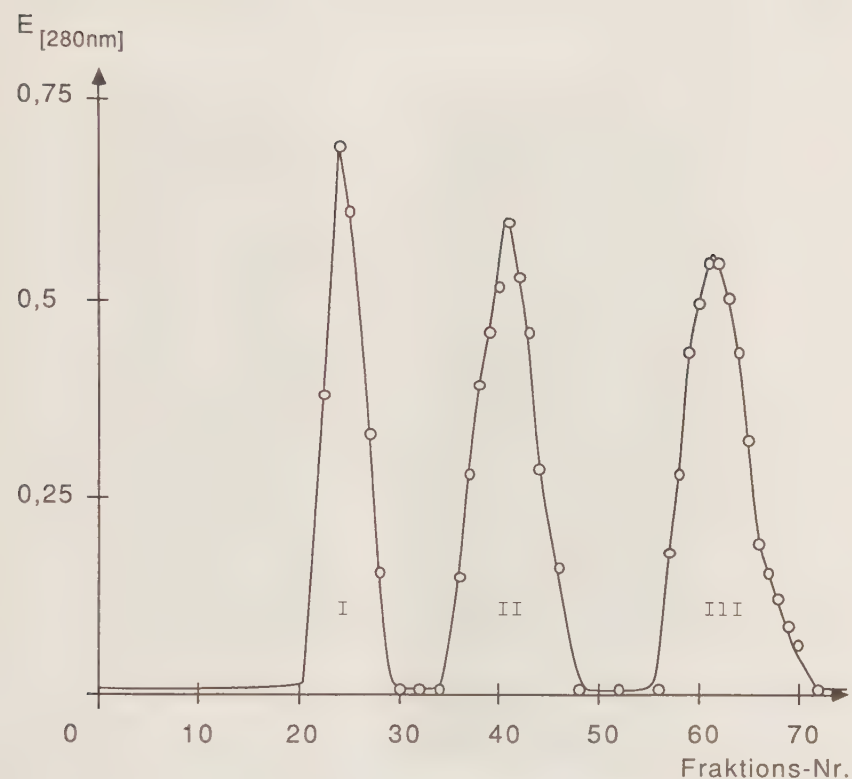


Abbildung 5: Isolierung und Reinigung von IgA, chromatographische Trennung von entfetteter und durch Natriumsulfat globulingefällter Taubenkropfmilch an Ultrogel AcA22 in Tris-HCl-Puffer pH 8,0
 Elutionsgeschwindigkeit: 5 ml/30 min
 Auftragsvolumen: 5 ml

I Lipoproteine

II Kropfmilch-IgA

III Kropfmilch-IgG und Proteine kleineren Molekulargewichts

4.4 Reinheitsüberprüfung und Molekulargewichtsbestimmung

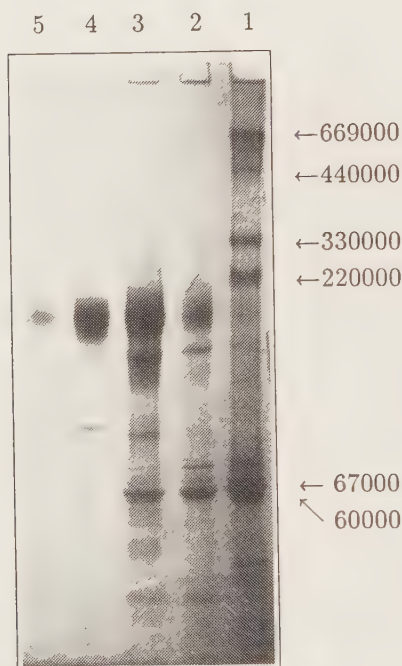


Abbildung 6: Reinigung von IgG aus dem Taubenserum (Lineares Porengradientengel, 3 – 15%)

1. Molekulargewichtsmarker (Calibration Kit for High Molecular Weight Proteins, Fa. Pharmacia)
- 2./3. Serum nach der Gelfiltration an Ultrogel AcA34
4. Serum nach der Anionenaustauschchromatographie an DEAE 52
5. Serum nach der Gelfiltration an Ultrogel A6, IgG-Reinprodukt

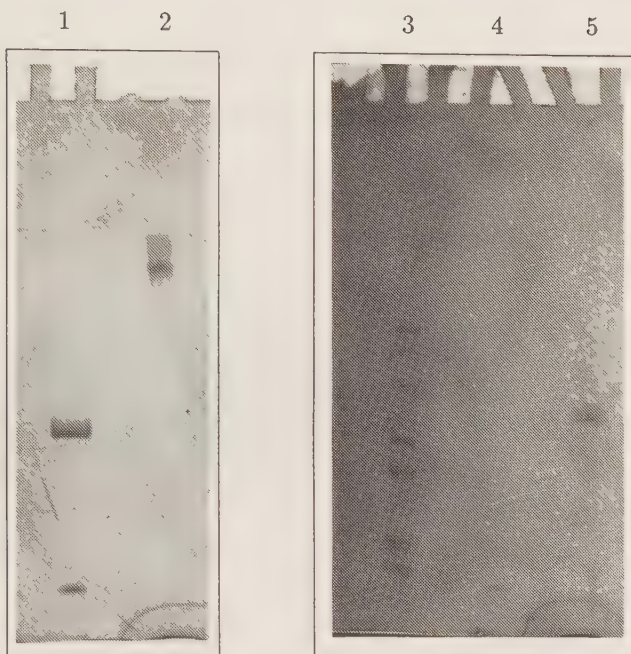


Abbildung 7: Isolierung der schweren und leichten Ketten aus dem IgG-Gesamtmolekül (Lineares Porengradientengel, 3 – 15%)

1. IgG (Serum nach Behandlung mit 2-Mercaptoäthanol, schwere und leichte Ketten)
2. IgG Serum
3. Molekulargewichtsmarker (Prestained SDS Molecular Weight Proteins, Fa. Sigma)
4. Leichte Ketten
5. Schwere Ketten

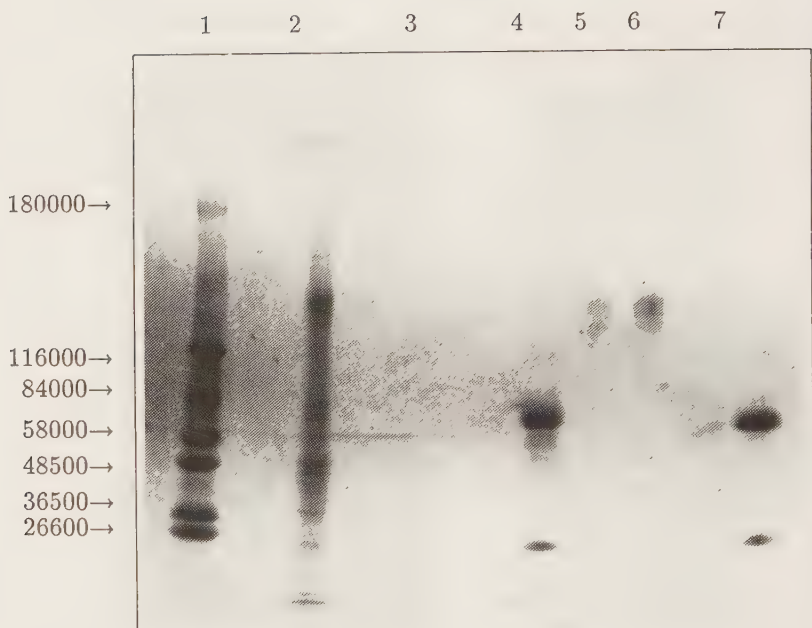


Abbildung 8: Reinigung von IgA aus der Taubenkropfmilch (Lineares Porengradientengel, 3 – 15%)

1. Molekulargewichtsmarker (Prestained SDS Molecular Weight Standard Mixture, Fa. Sigma)
2. Kropfmilch nach Entfettung und Globulinfällung
3. Kropfmilch-IgA nach Gelfiltration an Ultrogel AcA22
4. IgA nach Behandlung mit 2-Mercaptoäthanol (schwere und leichte Ketten)
5. Kropfmilch-IgG
6. Serum-IgG
7. IgG (Serum) nach Behandlung mit 2-Mercaptoäthanol (schwere und leichte Ketten)

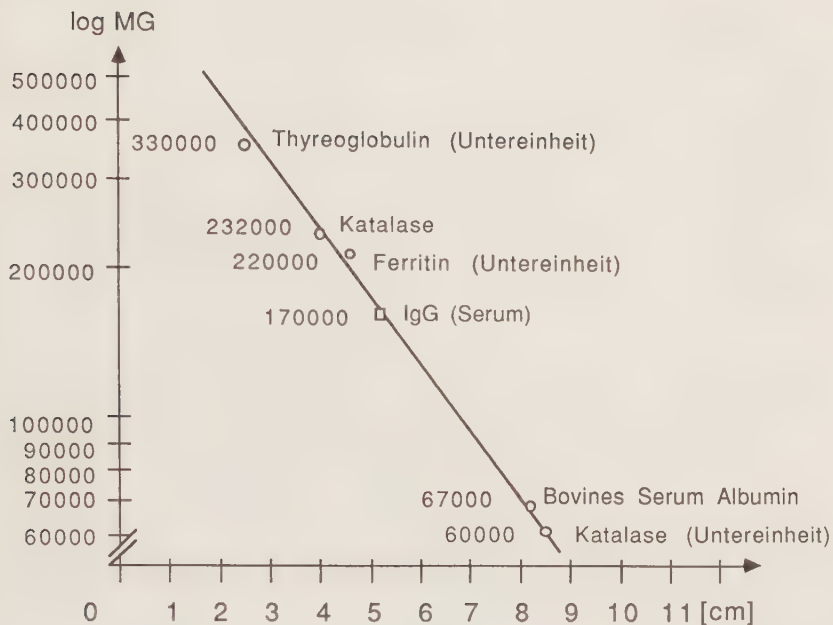


Abbildung 9: Eichgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts des aus dem Taubenserum isolierten IgG (Molekulargewichtsmarker, Fa. Pharmacia)

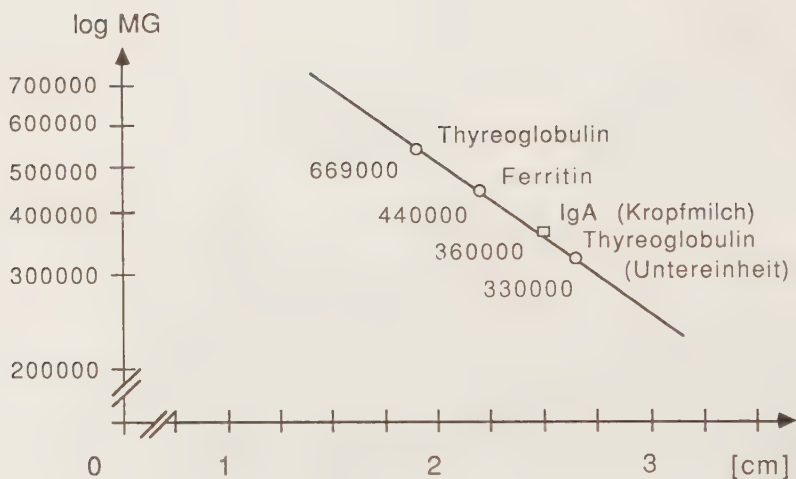


Abbildung 10: Eichgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts des aus der Taubenkropfmilch isolierten IgA (Molekulargewichtsmarker, Fa. Pharmacia)

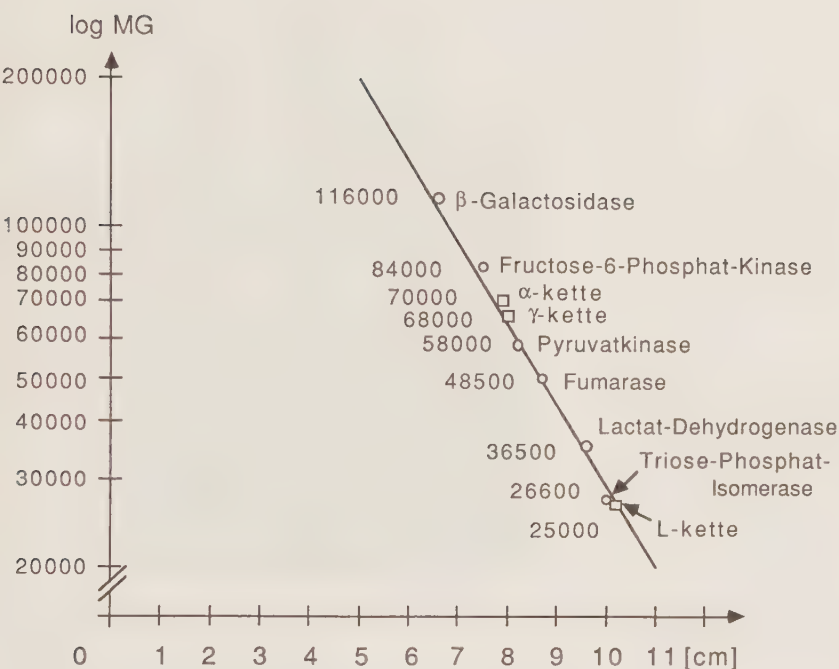


Abbildung 11: Eichgerade zur Bestimmung der Molekulargewichte der α -Kette und γ -Kette
(Molekulargewichtsmarker, Fa. Sigma)

Immunglobulin	Molekulargewicht
IgG	170000
γ -Kette	68000
IgA	360000
α -Kette	70000
Leichte Kette	25000

Tabelle 2: Molekulargewichte der aus Tauben isolierten Immunglobuline IgA und IgG, sowie der nach 2-Mercaptoäthanolbehandlung entstehenden Untereinheiten

4.5 Überprüfung der Monospezifität der hergestellten Antiseren gegen die Immunglobuline IgA und IgG der Taube

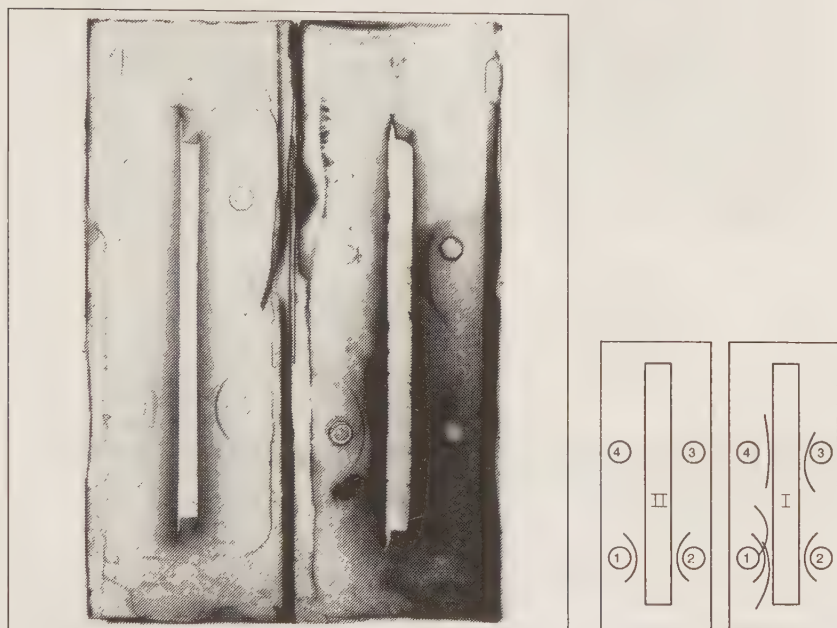


Abbildung 12: IgA-Antiserum vor und nach der Absättigung mit IgG-haltigen Serumfraktionen

(Immunelektrophorese nach Scheidegger (1955))

1. Taubenserum entfettet

2. Kropfmilch-IgA

3. Serum-IgG

4. Leichte Ketten

I Antiserum vor der Absättigung

II Antiserum nach der Absättigung

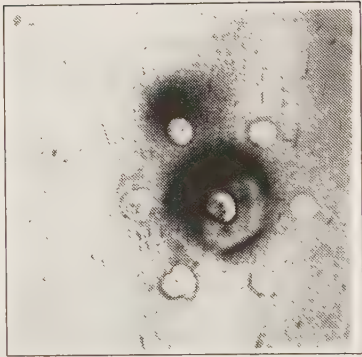
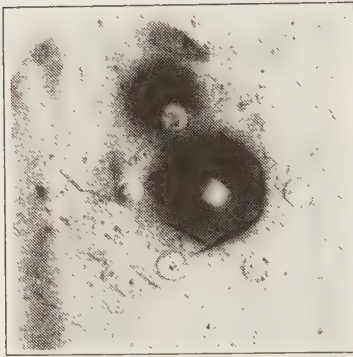


Abbildung 13: Antiserum gegen IgG und gegen γ -Ketten im Vergleich (Agargelpräzipitation nach Ouchterlony (1948))

1. Taubenserum entfettet
 2. γ -Ketten
 3. Leichte Ketten
 4. IgG (Fa. Calbiochem)
 5. Kropfmilch-IgA
 6. IgG- und IgA-haltige Serumfraktionen
- I Antiserum gegen IgG
- II Antiserum gegen γ -Ketten

4.6 Serologisches Verfahren zur Konzentrationsbestimmung

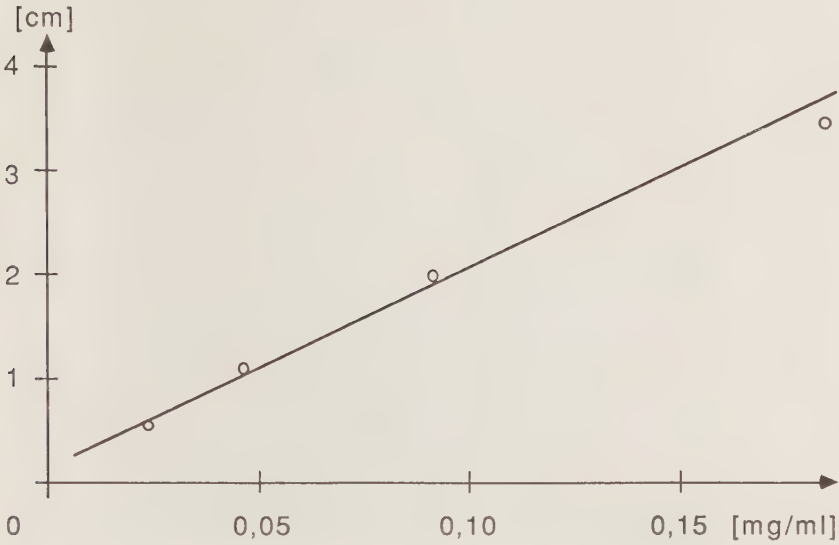


Abbildung 14: Abhängigkeit der Präzipitationshöhe von der IgG-Konzentration in der Rocket-Immunelektrophorese

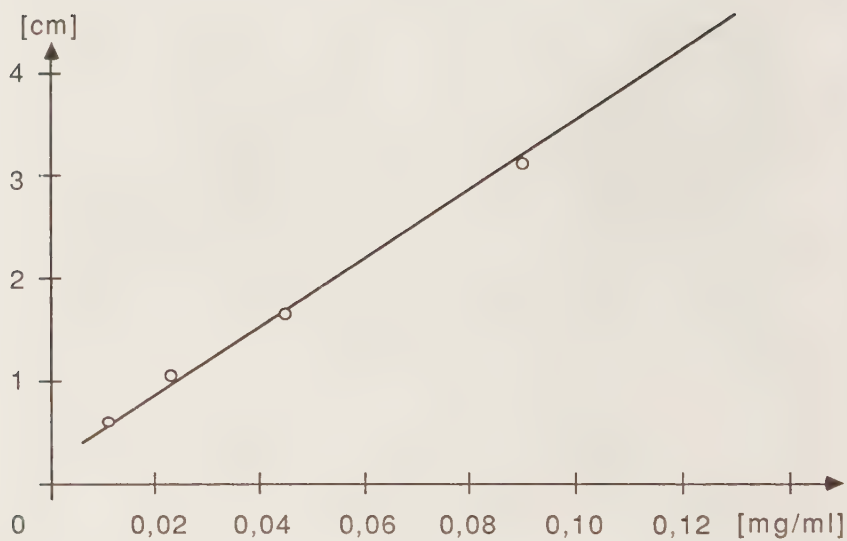
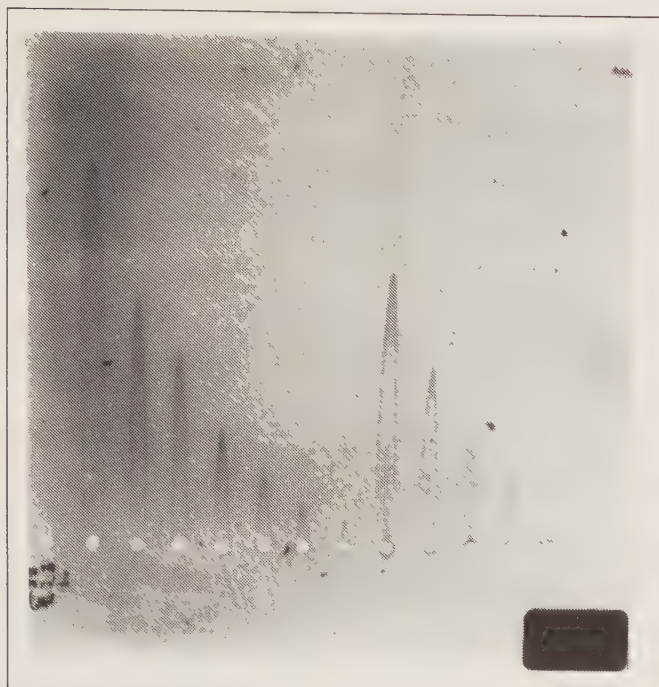


Abbildung 15: Abhängigkeit der Präzipitationshöhe von der IgA-Konzentration in der Rocket-Immunelektrophorese (s. Abb. 16)



IgA
(Kropfmilch)

IgA
(Serum)

Abbildung 16: Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell (1966) am Beispiel der Konzentrationsbestimmung für IgA (Coomassie-Färbung)

4.7 Ergebnisse der mit Hilfe der Rocket-Immunelektrophorese durchgeführten Konzentrationsbestimmungen von IgG und IgA in den untersuchten Proben

Der für alle quantitativen Bestimmungen als Standard dienende Taubenserumpool wurde, wie im Abschnitt 3.7 ausgeführt, an den zuvor hergestellten Immunglobulin-Reinprodukten mit bekanntem Proteingehalt geeicht.

Es ergaben sich folgende Konzentrationen:

5,92mg IgG/ml Standardserum

0,17mg IgA/ml Standardserum

Mit Hilfe dieses Standards konnten in den verschiedenen Proben die Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden.

Serum der adulten Tauben

Im Serum der männlichen Tauben wurde eine durchschnittliche IgG-Konzentration von 6,45mg/ml und eine IgA-Konzentration von 0,16mg/ml bestimmt.

Weibliche Tauben wiesen mit 7,32mg/ml durchschnittlich höhere Serum-IgG-Gehalte auf. Der Unterschied war jedoch statistisch abgesichert nicht signifikant. Die IgA-Konzentration von 0,19mg/ml im Serum der weiblichen Tauben wich dagegen kaum von der der männlichen Tiere ab.

Eiklar

Vor der Zugabe von DTT bzw. vor der Präparation der Eiklarproben nach Rose et al. (1974) wurden alle Proben einer Volumenbestimmung unterzogen. Das durchschnittliche Gesamtvolumen des Eiklars in den hier untersuchten unbebrüteten Taubeneiern betrug 13,9ml.

In keiner der Proben konnte IgG quantitativ erfaßt werden, während das IgA in einer relativ hohen Konzentration von 1,56mg/ml vorlag. Die beiden nach Rose et al. (1974) präparierten Eiklarproben wiesen ähnlich hohe IgA-Konzentrationen von 1,32mg/ml und 1,41mg/ml auf.

Eidotter

Das durchschnittliche Gesamtvolumen der untersuchten Dotterproben unbebrüteter Taubeneier lag bei 3,9ml. IgG konnte hier in einer durchschnittlichen Konzentration von 5,37mg/ml nachgewiesen werden.

Die Bestimmung von IgA war erst nach zehnfacher Konzentrierung des aufgearbeiteten Dottermaterials möglich. Es lag in einer durchschnittlichen Konzentration von 0,02mg/ml vor.

Amnionflüssigkeit

In der Amnionflüssigkeit konnte am 9. und 11. Bebrütungstag weder IgG noch IgA nachgewiesen werden.

Dottersack der Eintagsküken

Für die Dottersackproben ergab sich ein durchschnittliches Gesamtvolumen von 1,4ml.

In den hier untersuchten Proben lag die durchschnittliche IgG-Konzentration bei 6,46mg/ml. IgA konnte in einer geringeren Konzentration von 0,4mg/ml quantitativ erfaßt werden.

Kropfmilch der Eintagsküken

Im Hinblick auf die Konzentrationsberechnung wurden auch die Volumina der Kropfmilchproben vor der weiteren Aufarbeitung bestimmt. Sie wiesen jedoch je nach der Zeitspanne, die zwischen der Fütterung und der Entnahme lag, starke Schwankungen auf, die es nicht sinnvoll erscheinen ließen, ein Durchschnittsvolumen anzugeben.

Die Kropfmilch enthielt durchschnittlich 0,34mg IgG/ml. IgA lag in der weit höheren Konzentration von 1,45mg/ml in der Kropfmilch vor.

Serum der Eintagsküken

Um sicherzustellen, daß die Eintagsküken keinen elterlichen Kontakt hatten, wurden vier Taubeneier künstlich bebrütet und nach dem Schlupf der Taubenküken das Blut entnommen. Das Serum der Eintagsküken enthielt vor der Kropfmilchaufnahme durchschnittlich 4,1mg IgG/ml. Nach der Kropfmilchaufnahme lag die IgG-Serum-Konzentration bei 3,94mg/ml. IgA konnte nur nach fünffacher Konzentrierung des Eintagskükenserums

quantitativ erfaßt werden. Vor der Kropfmilchaufnahme gelang auch dann kein Nachweis von IgA, während nach der Kropfmilchaufnahme eine geringe durchschnittliche IgA-Konzentration von 0,004mg/ml errechnet werden konnte.

Serum der Jungtauben

Die Serum-IgG-Konzentration erreichte am 2. Lebenstag mit 5,21mg/ml den höchsten gemessenen Wert. Anschließend fiel die IgG-Konzentration vom 4. Tag mit durchschnittlich 2,96mg/ml über den 7. Tag mit 2,31mg/ml auf 0,69mg/ml am 14. Tag kontinuierlich ab.

IgA konnte bis zu diesem Zeitpunkt auch nach Konzentrierung des Serums nicht nachgewiesen werden. Am 21. Lebenstag war der Gehalt des Serums an IgG auf durchschnittlich 3,71mg/ml angestiegen. IgA war nun erstmalig ohne weitere Behandlung des Serums quantitativ erfaßbar. Es lag hier in einer durchschnittlichen Konzentration von 0,016mg/ml vor.

Am 28. Lebenstag konnte ein weiterer Konzentrationsanstieg beider Immunglobuline festgestellt werden. Es waren nun Konzentrationen von 4,47mg IgG/ml und 0,042mg IgA/ml im Serum der Jungtauben meßbar.

4.7.1 **Tabellarische Übersicht über die gemessenen Konzentrationen von IgG und IgA in den untersuchten Proben**

Taube ♂	Serum
<i>n</i>	8
	$\bar{x}$ σ
IgG	6,45 1,79
IgA	0,16 0,06

Tabelle 3: Männliche Tauben, Konzentrationen von IgG und IgA im Serum

Taube ♀	Serum	Eiklar	Eidotter
<i>n</i>	8	10	10
	$\bar{x}$ σ	$\bar{x}$ σ	$\bar{x}$ σ
IgG	7,32 1,82	<0,01	5,37 1,83
IgA	0,19 0,10	1,56 0,77	0,02* 0,01

* Nachweis nach zehnfacher Konzentrierung des aufgearbeiteten Dottermaterials

Tabelle 4: Weibliche Tauben, Konzentrationen von IgG und IgA im Serum, Eiklar und Eidotter

Eintags- küken	Serum vor der Kropfmilchaufnahme		Serum nach der Kropfmilchaufnahme	
n	4		10	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
IgG	4,10	0,56	3,94	0,87
IgA	<0,005*		<0,005**	

* nach fünffacher Konzentrierung kein Nachweis von IgA

** nach fünffacher Konzentrierung konnte eine durchschnittliche Konzentration von 0,004mg IgA/ml errechnet werden

Tabelle 5: Eintagsküken, Konzentrationen von IgG und IgA im Serum vor und nach der Kropfmilchaufnahme

Eintags- küken	Dottersack		Kropfmilch	
n	10		10	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
IgG	6,46	0,77	0,34	0,16
IgA	0,40	0,24	1,45	0,30

Tabelle 6: Eintagsküken, Konzentrationen von IgG und IgA in Dottersack und Kropfmilch

Jungtaube Serum	n		IgG	IgA
2. Tag	5	$\bar{x}$	5,21	<0,005*
		σ	1,19	
4. Tag	5	$\bar{x}$	2,96	<0,005*
		σ	0,76	
7. Tag	5	$\bar{x}$	2,31	<0,005*
		σ	0,43	
14. Tag	5	$\bar{x}$	0,69	<0,005*
		σ	0,28	
21. Tag	5	$\bar{x}$	3,71	0,016
		σ	0,49	0,006
28. Tag	5	$\bar{x}$	4,47	0,042
		σ	0,90	0,008

* nach fünffacher Konzentrierung kein Nachweis von IgA

Tabelle 7: Jungtauben, Serumkonzentrationen von IgG und IgA zwischen dem 2. und 28. Lebenstag

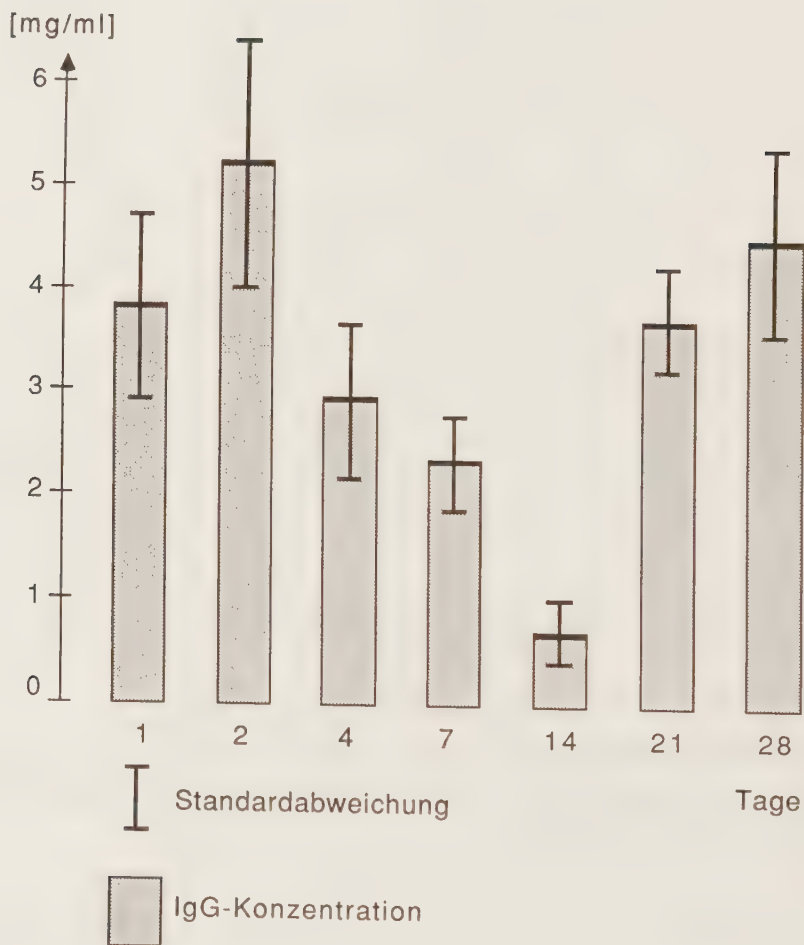


Abbildung 17: Serum-IgG-Konzentrationen der Taubenküken bzw. Jungtauben zwischen dem 1. und 28. Lebenstag

5 Diskussion

5.1 Besprechung der Methoden

Isolierung der Immunglobuline

Die Isolierung von IgG aus dem Serum durch Gelchromatographie und Anionenaustauschchromatographie entspricht im wesentlichen den allgemein angewendeten Standardmethoden und bedarf hier keiner weiteren Erläuterung.

Zur Isolierung von IgA jedoch ist zu sagen, daß diese bei anderen Vögeln zumeist aus der Gallenflüssigkeit vorgenommen wird, da dort dieses Immunglobulin in relativ hohen Konzentrationen vorliegt. Für das Haushuhn liegen Angaben von 12mg/ml (Leslie et al., 1976) über 6,72mg/ml (Rammensee, 1984) bis zu 3,15mg/ml (Lebacq-Verheyden et al., 1974) vor.

Da die Taube keine Gallenblase besitzt, ist zur Gewinnung des Gallensekrets ein operativer Eingriff zum Anlegen einer Fistel erforderlich (Goudswaard et al., 1977). Diese Operation sieht eine Ligatur und Drainage des Teiles des Dünndarms vor, in den der Ductus choledochus mündet. Die Gallenflüssigkeit wird in einem am Tierkörper befestigten kleinen Plastikbehälter über mehrere Tage gesammelt. Während dieser Zeit darf die Taube nicht gefüttert werden. Neben tierschützerischen Aspekten dieses Vorgehens, bietet die Isolierung von IgA aus der Kropfmilch den Vorteil, daß bereits nach der ersten Gelfiltration ein hochgereinigtes Produkt zur Verfügung steht.

Aus Abb. 8 geht hervor, daß die Kropfmilch in der SDS-Gelelektrophorese nach der Entfettung und Globulinfällung für die spätere Gelfiltration ein geeignetes Proteinmuster besitzt. Die dem IgA bzw. dem IgG entsprechenden Banden liegen relativ weit auseinander. Zwischen diesen Banden können keine weiteren verunreinigenden Proteine identifiziert werden. Unter diesen Voraussetzungen erfolgt eine vollständige Trennung von IgA und IgG an Ultrogel AcA22 aus der Taubenkropfmilch (s. Abb. 5).

Serologisches Verfahren zur Konzentrationsbestimmung

Für die quantitative Bestimmung von Immunglobulinen stehen in der Hauptsache drei gebräuchliche Methoden zur Verfügung:

1. Radiale Immundiffusion (Mancini et al., 1965)
2. Radioimmunassay (Yalow und Berson, 1960)
3. Rocket-Immunelektrophorese (Laurell, 1966)

Die Methode der Radialen Immundiffusion (Mancini et al., 1965) erscheint im Rahmen dieser Arbeit als weniger geeignet, da monomere und dimere Immunglobulinstrukturen im antikörperhaltigen Agar unterschiedliche Diffusionsverhalten aufweisen. Monomere haben gegenüber Polymeren einen deutlichen Diffusionsvorteil (Haris dangkul et al., 1975). Für die Konzentrationsbestimmungen von IgA, welches in den hier untersuchten Proben sowohl in der dimeren (Serum, Kropfmilch) als auch in der monomeren Struktur (Serum) vorliegen kann, würde dies zu Ungenauigkeiten bei der Auswertung führen.

Der für die Quantifizierung weiterhin in Betracht kommende Radioimmunassay (Yalow und Berson, 1960) ist der in dieser Arbeit gewählten Methode zwar an Empfindlichkeit überlegen, jedoch erscheint er als Routineverfahren weniger geeignet.

Mit einem relativ geringen apparativen Aufwand stellt die Rocket-Immunelektrophorese (Laurell, 1966) eine äußerst praktikable Methode dar; die gut reproduzierbaren Ergebnisse liegen bereits nach 20 Stunden vor. Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens ist mit 0,005mg/ml für IgA und 0,01mg/ml für IgG zumindest als ausreichend anzusehen.

Darüber hinaus bietet die Rocket-Immunelektrophorese gegenüber der Radialen Immundiffusion den Vorteil, daß monomere und dimere Immunglobulinstrukturen hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Mobilität in Agarose keinerlei Unterschiede zeigen (Jaquet et al., 1974).

Die in dieser Arbeit verwendete Agarose C zeichnet sich durch eine niedrige Endosmose aus. Diese Eigenschaft verhindert zum einen die Wanderung von IgG in Richtung Kathode und zum anderen kann hierdurch das Auflagen unter Spannung vermieden werden.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch den Vergleich mit einem als Standard dienenden Taubenserumpool. Es wurden nur solche Präzipitate in die Auswertung einbezogen, die in den in Abb. 14 und Abb. 15 angegebenen linearen Bereichen lagen (linearer Regressionskoeffizient $R^2 = 0,99$).

5.2 Besprechung der Ergebnisse

Bestimmung der Molekulargewichte

Goudswaard et al. (1977) nehmen für die Immunglobuline IgG und IgA der Taube aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität und ihres Verhaltens bei der gelchromatographischen Trennung dem Haushuhn ähnliche Molekulargewichte an. Dieses kann durch vorliegende Untersuchungen bestätigt werden. Das Molekulargewicht von Tauben-IgG wird hier mit 170.000 bzw. 186.000 nach Addition der Molekulargewichte der schweren und leichten Ketten bestimmt. Dies entspricht im wesentlichen den Angaben für das Haushuhn (Leslie und Clem, 1969).

Das in der Kropfmilch vorhandene IgA liegt in dimerer Struktur vor. Monomeres IgA wie es z.B. im Serum vorkommt, kann hier in der SDS-Gelelektrophorese nicht nachgewiesen werden.

In der Agargelpräzipitation nach Ouchterlony zeigen Goudswaard et al. (1979), daß das in Speichel und Kropfmilch enthaltene IgA vollständig identisch ist und schließen daraus, daß das IgA der Kropfmilch wahrscheinlich nicht mit einer Sekretkomponente ausgestattet ist. Unter der Voraussetzung, daß die Sekretkomponente ein Molekulargewicht von 70.000 besitzt (Sanders und Case, 1977; Steward, 1984), unterstützt die vorliegende Untersuchung die Annahme der oben genannten Autoren. Nach Bestimmung des Molekulargewichts des Gesamtmoleküls und unter Berücksichtigung der Molekulargewichte von 70.000 für die α -Kette und 25.000 für die leichte Kette, kann die molekulare Masse des als Dimer in der Kropfmilch auftretenden IgA bei 360 – 380 kDa angesetzt werden. Bei Vorhandensein einer Sekretkomponente wäre ein entsprechend höheres Molekulargewicht zu erwarten. Da aber in der Literatur keine Angaben über eine dem Haushuhn und den Säugern homologen Sekretkomponente der Taube vorliegen, erscheint es unsicher, allein über die Molekulargewichtsbestimmung das Fehlen dieser Komponente zu postulieren.

Für weitere immunologische Studien an der Taube wäre die Abwesenheit des Sekretionsstückes des IgA der Taube von Vorteil, da somit eine einfache Isolation von α -Ketten durch Gelchromatographie möglich wäre.

Nach der Globulinfällung können in der SDS-Gelelektrophorese keine Proteine höheren Molekulargewichts gefunden werden. IgM liegt, wie Goudswaard et al. (1977) beschreiben, offensichtlich nicht in der Kropfmilch vor.

Konzentrationsbestimmungen in den untersuchten Proben

Serum

Die im Serum der adulten Tauben gemessenen IgG-Konzentrationen von durchschnittlich 6,45mg/ml bei männlichen Tieren und 7,32mg/ml bei weiblichen Tieren lassen zunächst daran denken, daß ein geschlechtsspezifischer Unterschied bestehen könnte. Nach Anwendung des U-Tests von Wilcoxon (Mann und Whitney, 1947) für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben ergibt sich keine Signifikanz. Ein Einfluß von Sexualhormonen insbesondere Östrogen auf das Immunsystem ist aus der Literatur bei Säugetieren und beim Haushuhn bekannt (Eidinger und Garrett, 1972; Kowalczyk et al., 1985; Schraner et al., 1987). Entsprechende Ergebnisse liegen auch für die Taube vor (Selvaraj und Pitchappan, 1985). Östrogene wirken steigernd auf die humorale Immunität, während die zellvermittelte Immunität negativ beeinflußt wird. Anhand einer größeren Stichprobenzahl von brütenden männlichen und weiblichen Tauben könnte sich diesbezüglich ein anderes Bild ergeben. Die Standardabweichung der IgG-Serumkonzentration bei beiden Geschlechtern ist hoch; die gemessenen Werte weisen keine annähernde Normalverteilung auf. Einen Hinweis dafür, daß die Probenzahl für Rückschlüsse auf die Population zu klein ist, liefert der Standardserumpool (Serum von 50 adulten Tauben ohne Berücksichtigung des Geschlechts). Mit 5,92mg IgG/ml liegt die durchschnittliche Konzentration unter der der Einzelproben und dürfte daher eher einem Mittelwert entsprechen.

Beim Haushuhn werden Werte von 5mg/ml (Leslie et al., 1976) über 5,5mg/ml (Lebacq-Verheyden et al., 1974) bis zu 43,3mg/ml (Kowalczyk et al., 1985) angegeben.

Im Gegensatz zu Goudswaard et al. (1977), die das IgA der Taube nur in konzentrierten Serumfraktionen nachweisen können, gelingt in der vorliegenden Untersuchung diese Darstellung bereits in lediglich entfettetem Serum (s. Abb. 12).

Das Serum-IgA der Taube liegt mit einer Konzentration von 0,16mg/ml (männliche Tiere) bzw. 0,19mg/ml (weibliche Tiere) jedoch unter den beim Haushuhn gemessenen Werten von 0,37mg/ml (Lebacq-Verheyden et al., 1974) und 0,35mg/ml (Leslie et al., 1976).

Eiklar

Im Eiklar des unbebrüteten Taubeneies kann im Rahmen dieser Untersuchungen kein IgG nachgewiesen werden. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von Goudswaard et al. (1977) sowie mit den für das Haushuhn gemachten Angaben (Rose et al., 1974; Rammensee, 1984).

Ein überraschendes Ergebnis stellt die gemessene hohe IgA-Konzentration im Taubeneiklar von durchschnittlich 1,56 mg/ml dar. Einen Hinweis auf die Richtigkeit dieses Befundes geben Goudswaard et al. (1977), die zwar keine quantitativen Untersuchungen durchgeführt haben, jedoch das IgA des Eiklars sowohl in der Immunelektrophorese als auch in der Agargelpräzipitation nach Ouchterlony leicht darstellen können. Auch die beiden nach Rose et al. (1974) präparierten Taubeneiklarproben weisen ähnlich hohe IgA-Konzentrationen auf. Die verhältnismäßig geringen Konzentrationsunterschiede zu den nach der DTT-Methode aufbereiteten Eiklarproben sind mit Sicherheit auf die Präparationstechnik zurückzuführen.

Im Eiklar des Hühnereies werden recht unterschiedliche IgA-Konzentrationen von 0,008mg/ml (Rammensee, 1984) bis zu 0,7mg/ml (Rose et al., 1974) gemessen, wobei der letztgenannte Wert von Kaspers (1988) nicht bestätigt werden kann.

Eidotter

Die durchschnittliche IgG-Konzentration im unbebrüteten Taubeneidotter beträgt 5,37mg/ml, wobei auch hier große Schwankungen bestehen, die ihren Ausdruck in einer entsprechend hohen Standardabweichung finden. Die Abhängigkeit der Konzentration im Dotter vom Gehalt des Serums an IgG läßt dies jedoch verständlich erscheinen (Kowalczyk et al., 1985; Lösch et al., 1986).

Entgegen den Ergebnissen von Goudswaard et al. (1977) bei der Taube, sowie den Befunden von Rose et al. (1974) und Rammensee (1984) im Hühnereidotter kann in dieser Arbeit nach zehnfacher Konzentrierung des aufgearbeiteten Dottermaterials IgA quantitativ bestimmt werden. Es liegt hier in einer durchschnittlichen Konzentration von 0,02mg/ml vor. Hierzu sei angemerkt, daß Kaspers (1988) über entsprechende Befunde (0,014mg IgA/ml) im Dotter des Hühnereies berichtet.

Amnionflüssigkeit

In der Amnionflüssigkeit ließen sich keine Immunglobuline nachweisen. Für die Entnahme der Amnionflüssigkeit wurden der 9. und 11. Bebrü-

tungstag gewählt, da die Embryonalentwicklung der Taube mit 17 Tagen gegenüber dem Haushuhn mit 21 Tagen um 4 Tage kürzer ist.

Aufgrund der beim Hühnerembryo bereits am 13. Bebrütungstag (Romanoff, 1960) bestehenden Kommunikation des Eiklars mit dem Amnion ist am 14. Tag der Embryonalentwicklung sowohl IgA als auch IgG in der Amnionflüssigkeit nachweisbar (Rammensee, 1984).

Gerade die hohe Konzentration an IgA im Eiklar des Taubeneies ließ erwarten, daß nach Öffnung der „seroamniotic connection“ dieses Immunglobulin im Amnion leicht zu erfassen ist. Durch vorliegende Untersuchung kann im Hinblick auf eine Bestimmung dieses Zeitpunkts keine Aussage getroffen werden. Es ist denkbar, daß der Zeitpunkt zur Entnahme der Amnionflüssigkeit (analog zum Hühnerembryo) falsch war. Aus der Literatur sind diesbezüglich keine Angaben verfügbar. Weitere Untersuchungen an Taubenembryonen sowie Nachweis von Immunglobulinen im Amnion zu einem späteren Stadium der Embryonalentwicklung müßten sich hier anschließen.

Dottersack

Im Dottersack der Taubeneintagsküken liegt das IgG in einer durchschnittlichen Konzentration von 6,46 mg/ml vor. Dieser Befund läßt sich durch den Konzentrierungsvorgang des Dotters während der Embryonalentwicklung um das 2 – 3fache (Volumenbestimmung) erklären. Auf das Gesamtvolumen des Dotters bzw. des Dottersacks bezogen, hat die Konzentration an IgG jedoch um das 2 – 3fache abgenommen, was auf einen Übertritt von Dottersack-IgG in den Kreislauf des heranwachsenden Embryos hinweist, wie es Loeken und Roth (1983) sowie Kowalczyk et al. (1985) beim Haushuhn beschreiben.

Der im Dottersack gefundene IgA-Gehalt von 0,4 mg/ml ist das Resultat von Konzentrierungsvorgängen auf der einen Seite und der Diffusion dieses Immunglobulins aus dem Eiklar in den Dotter nach dem Verschwinden der Membrana vitellina auf der anderen Seite (Hamilton, 1952; Saito und Martin, 1966).

Da beim Haushuhn lediglich für das IgG ein selektiver Transportmechanismus über das Dottersackepithel postuliert wird (Loeken und Roth, 1983; Kowalczyk et al., 1985), ist anzunehmen, daß das IgA nicht in den Kreislauf des Taubenembryos aufgenommen wird und sich somit im Dottersack anreichert.

Kropfmilch

In der den Eintagsküken entnommenen Kropfmilch liegen durchschnittliche IgG-Konzentrationen von 0,34mg/ml und IgA-Konzentrationen von 1,45mg/ml vor.

Die Tatsache, daß der Serum-IgA-Gehalt der adulten Tauben (0,19mg/ml) in erheblichem Maße von dem Gehalt der Kropfmilch an diesem Immunglobulin abweicht, legt die Annahme nahe, daß für IgA ein selektiver Transportmechanismus besteht (Goudswaard et al., 1979).

Der Kropf der Vögel stellt eine Ausbuchtung des Ösophagus dar und ist wie dieser mit einer kutanen Schleimhaut ausgestattet (Schwarze und Schröder, 1985). In der Schleimhaut des laktierenden Kropfes, sowie in den Speicheldrüsen und deren umliegenden Geweben können Goudswaard et al. (1977) nach Anfertigung von Paraffinschnitten und Hämatoxylin/Eosin-Färbung keine IgA-haltigen Immunozyten nachweisen. Aus diesem Grund nehmen die Autoren an, daß das in der Kropfmilch vorhandene IgA aus dem Blut via Speichel, der wie sie qualitativ nachweisen IgA enthält, in den Kropf gelangt. Letztlich beweisen ließe sich dies nur durch Injektion der Elterntiere mit radioaktiv markiertem IgA und Beobachtung der Ausscheidung über den Speichel.

Serum der Eintagsküken und Jungtauben

Im Serum der Eintagsküken kann das IgA nur nach Konzentrierung auf das Fünffache nachgewiesen werden. Vor der Kropfmilchaufnahme ist das IgA auch nach Konzentrierung nicht erfaßbar, während nach der Kropfmilchaufnahme geringe Konzentrationen von durchschnittlich 0,004mg/ml errechnet werden können. Es ist anzunehmen, daß wie Goudswaard et al. (1979) beschreiben, in beschränktem Umfang IgA auf dem Weg über die Kropfmilch das Taubenküken erreicht.

Die Tatsache, daß auch nach der Serumkonzentrierung bis zur 3. Lebenswoche kein IgA im Jungtaubenserum nachweisbar ist, weicht jedoch von den Ergebnissen der oben genannten Autoren ab, denen es gelingt, an 3 Tage alten Taubenküken einen Transfer von Kropfmilch-IgA festzustellen. Die von ihnen verwendete Methode der radioaktiven Markierung von Antikörpern und deren anschließende Quantifizierung ist allerdings weit empfindlicher als die hier angewandte Rocket-Immunelektrophorese.

In vorliegender Arbeit kann das IgA im Jungtaubenserum von der 3. Lebenswoche an ohne weitere Aufarbeitung quantitativ gemessen werden, was auf eine zu diesem Zeitpunkt bereits begonnene Eigensynthese der

heranwachsenden Taube hinweist.

Da offensichtlich nur verschwindend geringe IgA-Mengen über den Darm des Taubenküken resorbiert werden, ist anzunehmen, daß das in der Kropfmilch vorhandene IgA primär eine lokale Schutzfunktion an der Darmschleimhaut des Taubenjungen besitzt. Diese Gegebenheiten würden somit dem Kolostrum eines Säugers mit einer Placenta hämochorialis nahe stehen. Ob die Kropfmilch diesem Vergleich standhält, erscheint insofern fraglich, als das IgA des Kolostrums vorwiegend als sekretorisches, d.h. mit einer Sekretkomponente ausgestattetes Molekül vorliegt und nur als solches seine Schutzfunktion entfalten kann (Steward, 1984). Weitere Untersuchungen über das Vorhandensein einer Sekretkomponente am Darmepithel als Rezeptor sind notwendig.

Die im Serum der Eintagsküken gemessenen IgG-Konzentrationen von durchschnittlich 4,1 mg/ml vor der Kropfmilchaufnahme und 3,94 mg/ml nach der Kropfmilchaufnahme lassen den Schluß zu, daß über die Kropfmilch übertragenes IgG im Vergleich zum maternal über den Dotter übertragenen IgG wohl kaum einen Einfluß auf den Gehalt des Eintagsküken an diesem Immunglobulin nimmt.

Im weiteren Verlauf der Aufzucht ist zu beobachten, daß die IgG-Serumkonzentration am 2. Tag auf einen Wert von 5,21 mg/ml angestiegen ist. Offensichtlich gelangt hier noch IgG über das Dottersackepithel in den Kreislauf des Jungtieres. Anschließend beginnt eine merkliche Abnahme des IgG-Serumspiegels, der in der zweiten Lebenswoche mit durchschnittlich 0,69 mg/ml den geringsten gemessenen Wert erreicht. Ein Hinweis auf die Richtigkeit dieses Befundes ergibt sich aus den Untersuchungen von Vindevogel (1981). Maternal übertragene neutralisierende Antikörper gegen das Herpesvirus 1 der Taube erreichen am 14. Lebenstag die niedrigsten gemessenen Titer.

Es wird deutlich, daß bis zu diesem Zeitpunkt maternal übertragenes IgG von der Jungtaube sehr schnell abgebaut wird. Da dieser Zeitpunkt mit dem allmählichen Ende der Kropfmilchperiode zusammenfällt, kann angenommen werden, daß der erhöhten Infektionsanfälligkeit der Jungtaube in diesem Lebensabschnitt (Vogel, 1983) primär durch den niedrigen IgG-Antikörperspiegel Vorschub geleistet wird. Ab der 2. Lebenswoche scheint die Jungtaube bereits mit einer Eigensynthese von IgG zu beginnen. Dies wird durch den Anstieg der Serumkonzentration über die 3. bis zur 4. Lebenswoche auf durchschnittlich 4,47 mg/ml deutlich.

Vergleichende Untersuchungen am Haushuhn (Leslie et al., 1976) zeigen,

daß der Serum-IgG-Spiegel des Hühnerküken zwar prinzipiell einen ähnlichen Verlauf nimmt, jedoch ist der auf den Abbau der maternalen Antikörper folgende steile Anstieg der IgG-Serumkonzentration der Jungtaube beim Hühnerküken weniger stark ausgeprägt. Nach 7 Wochen liegen im Serum des heranwachsenden Huhns Konzentrationen von 4,87mg/ml vor.

Es besteht die Möglichkeit, daß bei Tauben embryonal eine Auswanderung von B-Zellen aus der Bursa Fabricii in die peripheren lymphatischen Organe stattfindet, oder daß unabhängig von der Bursa in anderen Geweben, wie z.B. in der fötalen Leber, im Knochenmark und in den lymphatischen Einrichtungen des Darmes B-Zellen reifen können. Einen entsprechenden Hinweis geben die Untersuchungen von Thompson und Linna (1975) sowie Thaxton und Grissom, Jr. (1984) an bursektomierten Tauben. Die Autoren beschreiben hier, daß eine neonatale Bursektomie bei 2 Stunden bzw. 24 Stunden alten Taubenküken, nach einer im Alter von 4 Wochen vorgenommenen Immunisierung mit Schafer erythrozyten, keinen hemmenden Einfluß auf die Bildung hämagglutinierender Antikörper sowie auf die Titer mercaptoäthanol-empfindlicher und -resistenter Antikörper hat.

Nach der Literatur und den eigenen Untersuchungen enthält das Eiklar des Taubeneies und die Kropfmilch biologisch interessante Mengen an IgA. Ob und gegebenenfalls in welcher Weise dieses IgA im Taubenküken wirksam werden kann, ist nach wie vor ungeklärt.

IgG wird ähnlich wie beim Hühnerküken über den Dottersack aufgenommen und während der ersten zwei Wochen bis gegen Null abgebaut. Gleichzeitig setzt eine substantielle Eigensynthese ein.

Eine frühe postnatale IgA-Synthese findet, für das Haushuhn beschrieben, in der Harder'schen Drüse und anderen paraokkulären Geweben (Tränen-drüse) statt (Hoffmann-Fezer, 1978).

Ob die Kropfmilch neben den Immunglobulinen weitere Faktoren enthält, die wie etwa das Bursin des Haushuhns (Toivanen und Toivanen, 1987) eine Stimulation von Differenzierungsvorgängen der B-Zellen und der humoralen Abwehr bewirken, bleibt vorläufig Spekulationen überlassen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung und Reinigung von IgG aus dem Taubenserum, die Herstellung von γ -Ketten, sowie die Isolierung und Reinigung von IgA aus der Taubenkropfmilch dargestellt.

Durch Immunisierung von Kaninchen konnten monospezifische Antiseren gegen beide Immunglobuline gewonnen werden.

Es wurde möglich, die passiv über das Ei und über die Kropfmilch auf das Taubenküken übertragenen Immunglobuline IgG und IgA mit Hilfe der Rocket-Immunelektrophorese quantitativ zu bestimmen.

Im Serum der adulten weiblichen Tauben lagen die IgG und die IgA-Konzentrationen bei 7,32mg/ml bzw. 0,19mg/ml. Ein signifikanter Unterschied zu erwachsenen männlichen Tauben konnte nicht festgestellt werden. Im Eidotter war IgG das dominierende Immunglobulin mit 5,37mg/ml. IgA konnte hier nur in Spuren nachgewiesen werden.

Im Eiklar war lediglich IgA quantitativ mit dem Achtfachen des Serumwertes zu erfassen.

In der Kropfmilch stellte ebenfalls das IgA mit ähnlich hohen Konzentrationen den Hauptanteil der Immunglobuline dar.

In der Amnionflüssigkeit waren am 9. und 11. Bebrütungstag keine Immunglobuline nachweisbar.

Das Serum der Eintagsküken enthielt lediglich IgG in meßbaren Mengen von 4,1mg/ml. Die Untersuchung des Serums vor und nach der Kropfmilchaufnahme ergab nur für IgA und hier nur in unerheblichem Maße eine minimale Zunahme.

Die Serum-IgG-Konzentration der Taubenküken erreichte ihr Maximum am 2. Lebenstag mit 5,21mg/ml, hervorgerufen durch die Resorption von IgG aus dem Dottersack. Anschließend fiel die IgG-Konzentration bis zum 14. Lebenstag kontinuierlich auf den geringsten gemessenen Wert von 0,69mg/ml, um nach einem steilen Anstieg bereits am 21. Tag wieder die den Eintagsküken entsprechende Serum-Konzentrationen zu erreichen. Zu diesem Zeitpunkt konnte IgA erstmalig quantitativ nachgewiesen werden.

EXAMINATIONS REGARDING THE PARENTAL TRANSFER OF
IMMUNOGLOBULINS IN PIGEONS
(*Columba livia*, Gmel., 1789, domestica)

Summary

During the work presented here, the isolation and purification of IgG from pigeon serum, the production of γ -chains, as well as the isolation and purification of IgA from crop milk of pigeons were performed. Monospecific antibodies against both immunoglobulins were produced by immunisation of rabbits.

It was possible to quantify the immunoglobulins IgG and IgA transferred passively to the squab by means of Rocket-immunoelectrophoresis.

The serum of the female adult pigeons contained 7.32mg/ml IgG, while the IgA concentration was only 0.19mg/ml. A significant difference to the adult males could not be demonstrated.

The dominating immunoglobulin in the egg yolk was IgG with 5.37mg/ml. IgA only was detectable in traces. IgA was exclusively quantified within the egg albumen yielding eight times the serum values. In the crop milk IgA also presented the main immunoglobulin, showing similar concentrations as in the egg white.

At the 9th and 11th day of incubation the amniotic fluid did not contain any demonstrable immunoglobulins.

The serum of day old squabs yielded solely measurable amounts of IgG (4.1mg/ml). Examinations of sera before and after intake of crop milk showed a negligible increase only for IgA.

The concentration of IgG in the serum reached the maximum at the second day of life (5.21mg/ml), caused by the absorption of IgG from the yolk sac. The IgG concentration then decreased continuously up to the 14th day of life towards the minimum of 0.69mg/ml followed by a steep increase that reached the start position of the day olds at the 21st day.

At this instant IgA could be demonstrated quantitatively for the first time.

ENSAYO SOBRE LA TRANSIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS PATERNALES EN LA PALOMA (*Columba livia*, Gmel., 1789, domestica)

Resumen

Se elaboraron el aislamiento y la purificación de IgG del suero de paloma, la producción de las cadenas gamma y el aislamiento y la purificación de IgA de la leche de buche.

A través de inmunización de conejos se produjeron antisueros monoespecíficos contra las dos inmunoglobulinas.

Usando la inmunolectroforesis Rocket se determinaron las inmunoglobulinas transferidas pasivamente a través del huevo y de la leche de buche al pichon cuantitativamente.

Las concentraciones de IgG y IgA en sueros de palomas adultas correspondieron a 7,32mg/ml y 0,19mg/ml respectivamente. No se pudo establecer una diferencia significativa en comparación a palomos.

En la yema IgG estuvo la inmunoglobulina dominante con 5,37mg/ml, mientras IgA se pudo demostrar solamente en cantidades muy pequeñas. En la clara de huevo se pudo determinar solamente IgA en una cantidad ocho veces más alta del suero.

En la leche de buche se encontraron IgA en una concentración comparablemente alta.

En el líquido amniótico de los días 9 y 11 de incubación no hubo inmunoglobulinas en cantidades demostrables.

El suero de los pichones de un día contuvo solamente IgG en cantidades mensurables de 4,1mg/ml. El examen del suero antes y después de la ingestión de leche de buche mostró solamente un aumento posterior mínimo de IgA.

La concentración de IgG en el suero de pichones alcanzó el máximo en el día segundo de vida debido a la resorción de IgG del saco vitelino con 5,21mg/ml. Después la concentración de IgG se bajó continuamente hasta el día 14 alcanzando un valor de solamente 0,69mg/ml. Después de una alza rápida la concentración de IgG del suero correspondió en el día 21 a la de los pichones de un día. A la misma fecha se pudo demostrar IgA por primera vez cuantitativamente.

Literaturverzeichnis

- Albini, B. and Wick, G. (1976): IgA surface determinants on cells from the chicken embryo. In: Immune reactivity of lymphocytes. Plenum Publishing Corporation, New York
- Bienenstock, J., Perey, D.Y.E., Gauldie, J. and Underdown, B.J. (1973): Chicken γ A: Physiochemical and immunochemical characteristics. J. Immunol., 110, No 2, 524 – 533
- Burns, R.B. and Maxwell, M. (1984): Aus: Freeman, B.M. Physiology of the domestic fowl., 5, pp 296
- Burstein, M., Samaille, J. (1959): Nouvelle méthode de séparation et de dosage des lipoproteins de faible densité. Ann. Biol. Clin., 17, 23 – 34
- Buxten, A. (1952): On the transference of bacterial antibodies from the hen to the chick. J. gen. Microbiol., 7, 268 – 286
- Chen, C.L.H., Lehmeier, J.E. and Cooper, M.D. (1982): Evidence for an IgD homologue on chickens lymphocytes. J. Immunol., 129, 2580 – 2585
- Dumont, J.N. (1965): Prolactin induced cytological changes in the mucosa of the pigeon crop during crop milkformation. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 68, 755 – 782
- Edwards, J.H., Fink, J.N. and Barboriak, J.J. (1969): Excretion of pigeon serum proteins in pigeon droppings. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 132, 907 – 911
- Eidinger, D. and Garrett, T. J. (1972): Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. J. Exp. Med., 135, 1098 – 1116
- Fehér, G. (1975): Die ontogenetische Entwicklung des Dottersackstiels der Hausvögel und seine Rolle bei der Absorption des Dotters. Anat., Histol., Embryol., 4, 113 – 126

- Goudswaard, J., Vaerman, J.-P. and Heremans, J.F. (1977): Three immunoglobulin classes in the pigeon (*Columba livia*).
Int. Archs. Allergy appl. Immun., **53**, 409 – 419
- Goudswaard, J., Noordizij, A. and Stam, J.W.E. (1978): Pigeon IgA: A major antigen in pigeon breeder's disease.
Immunological Communications, **7(6)**, 661 – 668
- Goudswaard, J., van der Donk, J.A., van der Gaag, I. and Noordizij, A. (1979): Peculiar IgA transfer in the pigeon from mother to squab.
Develop. Comp. Immunol., **3**, 307 – 319
- Guttman, R.M., Tebo, T., Edwards, J.J., Barboriak, J. and Fink, J.N. (1971): The immune response of the pigeon (*Columba livia*).
J. Immunol., **106**, No. 2, 392 – 396
- Hamilton, H.L. (1952): Lillie's development of the chick. An introduction to embryology.
Henry Holt, New York
- Harisdangkul, V., McDougal, J.S., Knapp, M. and Christian, C.L. (1975): Naturally occurring low molecular weight IgM in patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and macroglobulinemia.
J. Immunol., **115**, 216 – 221
- Hoffmann-Fezer, G. (1978): Die Morphologie des Immunsystems beim Huhn.
DVG, Symposium der Fachgruppe Geflügelkrankheiten 13./14. Juni 1978
- Jaquet, H., Burkhard, M. and Herzig, A.L. (1974): A method for demonstrating mono- and oligomeric units of IgA myeloma proteins in the mouse.
J. Immunol. Meth., **4**, 359 – 362
- Kaspers, B. (1987): Persönliche Mitteilung
- Kaspers, B., Schraner, I., Lösch, U. (1988): IgA im Dotter des Hühner-
eies.
DVG, 8. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie
25./26. März, München 1988

- Kincade, P.W. and Cooper, M.D. (1971): Development and distribution of immunoglobulin-containing cells in the chicken.
J. Immunol., 106, 371 – 382
- Kobayashi, K. and Hirai, H. (1980): Studies on subunit components of chicken polymeric immunoglobulins.
J. Immunol., 124, 1695 – 1704
- Kowalczyk, K., Daiss, J., Halpern, I. and Roth, T.F. (1985): Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken.
Immunology, 54, 755 – 762
- Kramer, T.T. and Cho, H.C. (1970): Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg.
Immunology, 19, 157 – 167
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227, 680 – 685
- Laurell, C.-B. (1966): Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem., 15, 45 – 52
- Lebacqz-Verheyden, A.-M., Vaerman, J.-P. and Heremans, J.F. (1972): A possible homologue of mammalian IgA in chicken serum and secretions.
Immunology, 22, 165 – 175
- Lebacqz-Verheyden, A.-M., Vaerman, J.-P. and Heremans, J.F. (1974): Quantitation and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions.
Immunology, 27, 683 – 692
- Lebacqz-Verheyden, A.-M. and Ritter, M.A. (1979): B-cell precursors in early chicken embryos.
Immunology, 37, 123 – 134
- Leslie, G.A. and Clem, L.W. (1969): Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken.
J. exp. Med., 130, 1337 – 1352

- Leslie, G.A., Wilson, H.R. and Clem, L.W. (1971): Studies on the secretory immunologic system of fowl. I. Presence of immunoglobulins in chicken secretions.
J. Immunol., **106**, 1441 – 1446
- Leslie, G.A. and Martin, L.N. (1973): Studies on the secretory immunologic system of fowl. III. Serum and secretory IgA of the chicken.
J. Immunol., **110**, 1 – 9
- Leslie, G.A., Stankus, R.P. and Martin, L.M. (1976): Secretory immunological system of fowl. V. The gallbladder: an integral part of the secretory immunological system of fowl.
Int. Archs. Allergy appl. Immunol., **51**, 175 – 185
- Loeken, M.R., Roth, T.F. (1983): Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte.
Immunology, **49**, 21 – 28
- Lowry, O.H., Roseborough, N.J. and Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Bio. Chem., **193**, 265 – 275
- Lösch, U., Schraner, I., Wanke, R. and Jürgens, L. (1986): The chicken egg, an antibody source.
J. Vet. Med., B, **33**, 609 – 619
- Malkinson, M. (1965): The transmission of passive immunity to *Escherichia coli* from mother to young in the domestic fowl (*Gallus domesticus*).
Immunology, **9**, 311 – 317
- Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F. (1965): Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry, **2**, 235 – 254
- Mann, H.B. and Whitney, D.R. (1947): On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other.
Ann. Math. Statist., **18**, 50 – 60

- Meyer, F. und Seibert, B. (1987): Elektrophoretische Darstellung der Proteinkomponente der Kropfmilch von Haustauben (*Columba livia domestica*) durch isoelektrische Fokussierung und SDS-Elektrophorese.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 100, 23 – 25
- Müller, U., De Haller, R. and Grob, P.J. (1976): Serological investigations in 15 cases of bird fanciers disease.
Int. Archs. Allergy appl. Immun., 50, 341 – 358
- Orlans, E. and Rose, M.E. (1972): An IgA-like immunoglobulin in the fowl.
Immunochemistry, 9, 833 – 838
- Ouchterlony, Ö. (1948): Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Acta Pathol. Microbiol. Scand., 25, 186 – 191
- Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O. and Dixon, F.J. (1962): The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen.
J. gen. Physiol., 45, 501 – 513
- Ponstingl, H. und Hilschmann, N. (1976): Zur Strukturregel der Antikörper: Die Primärstruktur eines monoklonalen IgG₁-Immunglobulins (Myelomprotein Nie), II, Isolierung und Aminosäuresequenz der tryptischen Peptide der H-Kette.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Bd., 357, 1541 – 1570
- Porter, P. and Parry, S.H. (1976): Further characterization of IgA in chicken serum and secretions with evidence of a possible homologue of mammalian secretory component.
Immunology, 31, 407 – 415
- Rammensee, M. (1984): Immunglobulinkonzentrationen in Serum, Sekreten, Ei und Embryo des Haushuhns.
Vet. Diss., Universität München.
- Reade, P.C., Jenkin, C.R. and Turner, K.J. (1965): The synthesis by foetal chicks and rats of serum proteins having some properties of the immunoglobulins.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 43, 699 – 712

- Riddle, O. and Tange, M. (1928): Studies on the physiology of reproduction in birds. XXIV. On the extirpation of the Bursa Fabricii in young doves.
Am. J. Physiol., **86**, 266 – 272
- Roitt, I. (1977): Immunologie.
Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- Romanoff, A.L. (1960): The avian embryo, structural and functional development.
The Macmillan Company, New York
- Rose, M.E., Orlans, E. and Buttress, N. (1974): Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white.
Eur. J. Immunol., **4**, 521 – 523
- Rose, M.E. and Orlans, E. (1981): Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick.
Develop. comp. Immunol., **5**, 15 – 20
- Saito, Z. and Martin, W.G. (1966): Ovalbumin and other water soluble proteins in avian yolk during embryogenesis.
Can. J. Biochem., **44**, 293
- Sanders, B.G. and Case, W.L. (1977): Chicken secretory immunoglobulin. Chemical and immunological characterization of chicken IgA.
Comp. Biochem. Physiol., **56 B**, 273 – 278
- Scheidegger, J.J. (1955): Une microméthode de l'immunélectrophorèse.
Int. Arch. Allergy., **7**, 103 – 110
- Schranner, I., Lösch, U. und Merckenschlager, M. (1982): Das Serumproteinmuster des Haushuhns. Vergleichende Darstellung normaler und defekter Hühner.
Zbl. Vet. Med., A, **29**, 327 – 336
- Schranner, I. and Lösch, U. (1986): Immunological identification of avian monomeric and polymeric immunoglobulin M and immunoglobulin A after fractionation on sodium dodecylsulfate pore gradient polyacrylamide gels.
Poultry Science, **65**, 360 – 368

- Schranner, I., Dorn, W. und Lösch, U. (1987): Quantification of monomeric and polymeric IgM and IgA in chicken serum.
J. Vet. Med., B, 34, 407 – 420
- Schwarze, E. und Schröder, L. (1985): Kompendium der Geflügelanatomie.
4., überarbeitete Auflage, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart
- Selvaraj, P. and Pitchappan, RM. (1985): Effect of oestradiol dipropionate on the immune system of the pigeon (*Columba livia*).
Develop. Comp. Immunol., 9, 669 – 677
- Sennekamp, J., Grips, K.H., Felix, R. und Schoroth, P. (1974): Exogene allergische Alveolitis auf Huhn- und Taubenantigene, Vogelhalter-lunge.
Dtsch. med. Wschr., 99, 2570 – 2576
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, I.V. (1967): Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 815 – 820
- Steward, M.W. (1984): Antibodies: Their structure and function.
Chapman and Hall, London and New York
- Thaxton, J.P. and Grissom, Jr., R.E. (1984): Immunological responsiveness of the pigeon (*Columba livia*) following neonatal bursectomy.
Develop. comp. Immunol., 8, 141 – 148
- Thompson, K.D. and Linna, T.J. (1975): The inability of surgical bursectomy in the newly hatched period to affect antibody formation in the pigeon (*Columba livia*).
Immunological communications, 4(4), 309 – 324
- Tizard, I. (1981): Einführung in die veterinärmedizinische Immunologie.
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- Toivanen, A. and Toivanen, P. (1987): Avian immunology. Basis and practice, Vol 1
CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
- Vindevogel, H. (1981): Le coryza infectieux du pigeon.
Vet. Diss. Liège/Bruxelles-Cureghem

- Vogel, K. (1981): Die Taube: Biologie, Haltung, Fütterung.
2., unveränderte Aufl., VEB Deutscher Landwirtschaftsverl., Berlin
- Vogel, K. (1983): Die Taube: Taubenkrankheiten.
4., völlig neu erarbeitete Aufl., VEB Deutscher Landwirtschafts-
verl., Berlin
- Warr, G.W. (1982): Behaviour of unreduced polymeric and monomeric
immunoglobulins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel elec-
trophoresis.
Mol. Immunol., 19, 75 – 81
- Watanabe, H. and Kobayashi, K. (1974): Peculiar secretory IgA system
identified in chickens.
J. Immunol., 113, 1405 – 1409
- Weber, W. (1962): Zur Histologie und Cytologie der Kropfmilchbildung
der Tauben.
Z. Zellforsch., 56, 547 – 576
- Willoughby, E.W. and Lambert, A. (1983): A sensitive silver stain for
proteins in agarose gels.
Analytical Biochemistry, 130, 353 – 358
- Yalow, R.S. and Berson, S.A. (1960): Immunassay of endogenous plasma
insulin in man.
J. Clin. Invest., 39, 1157
- Yamamoto, H., Watanabe, H., Sato, G. and Mikami, T. (1975): Iden-
tification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody
activity.
Jap. J. vet. Res., 23, 131 – 140
- Ziegelmaier, R. (1969): Über die Resorption der Immunglobuline beim
Eintagsküken.
Vet. Diss., Universität München

Herrn Prof. Dr. J. Kösters möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des interessanten Themas sowie seine freundliche Unterstützung danken. Für viele gute Ratschläge und ihren persönlichen Einsatz bin ich Frau Prof. Dr. H. Gerlach zu Dank verpflichtet.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Geflügelkrankheiten besonders Dr. D. Schneegans und Andi danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung.

Allen Doktoranden am Institut danke ich für ihre Kollegialität und Hilfe bei der Betreuung meiner Tiere.

Bei Herrn Prof. Dr. U. Lösch bedanke ich mich in besonderem Maße für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz am Institut für Physiologie, für seine wissenschaftliche Beratung und seinen persönlichen Einsatz bei der Fertigstellung der Arbeit.

Für die herzliche Aufnahme im Lab. 20, für eine vorbildliche Betreuung und für eine schöne Zeit möchte ich mich an dieser Stelle bei Frau Dr. I. Schraner bedanken.

Bei Bernd Kaspers bedanke ich mich für viele fruchtbare Diskussionen und Anregungen sowie für seine hilfsbereite, freundschaftliche Unterstützung.

Frl. Susanne Klitgaard und Frau J. Cihakova danke ich für ihre zuverlässige technische Assistenz.

Für ihre Freundschaft bedanke ich mich bei Uffe, Ulla, Dani, Rainer und Susanne.

Lebenslauf

- 6. 4. 1960** geboren in Bonn, als Tochter des Hochschullehrers Prof. Dr. Edmund Greuel und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Nopper
- 1966 – 1969** Katholische Grundschule in Röttgen bei Bonn
- 1969 – 1978** Staatliches Gymnasium Bonn-Röttgen
- 19. 6. 1978** Hochschulreife
- 1978 – 1980** Ausbildung als veterinärmedizinisch technische Assistentin am Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt in Krefeld
- 14. 3. 1979** Tod meiner Mutter
- 1980 – 1986** Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 15. 7. 1986** Staatsexamen Veterinärmedizin
- 17. 9. 1986** Approbation
- 11. 1986 –** Arbeit an der vorliegenden Dissertation

